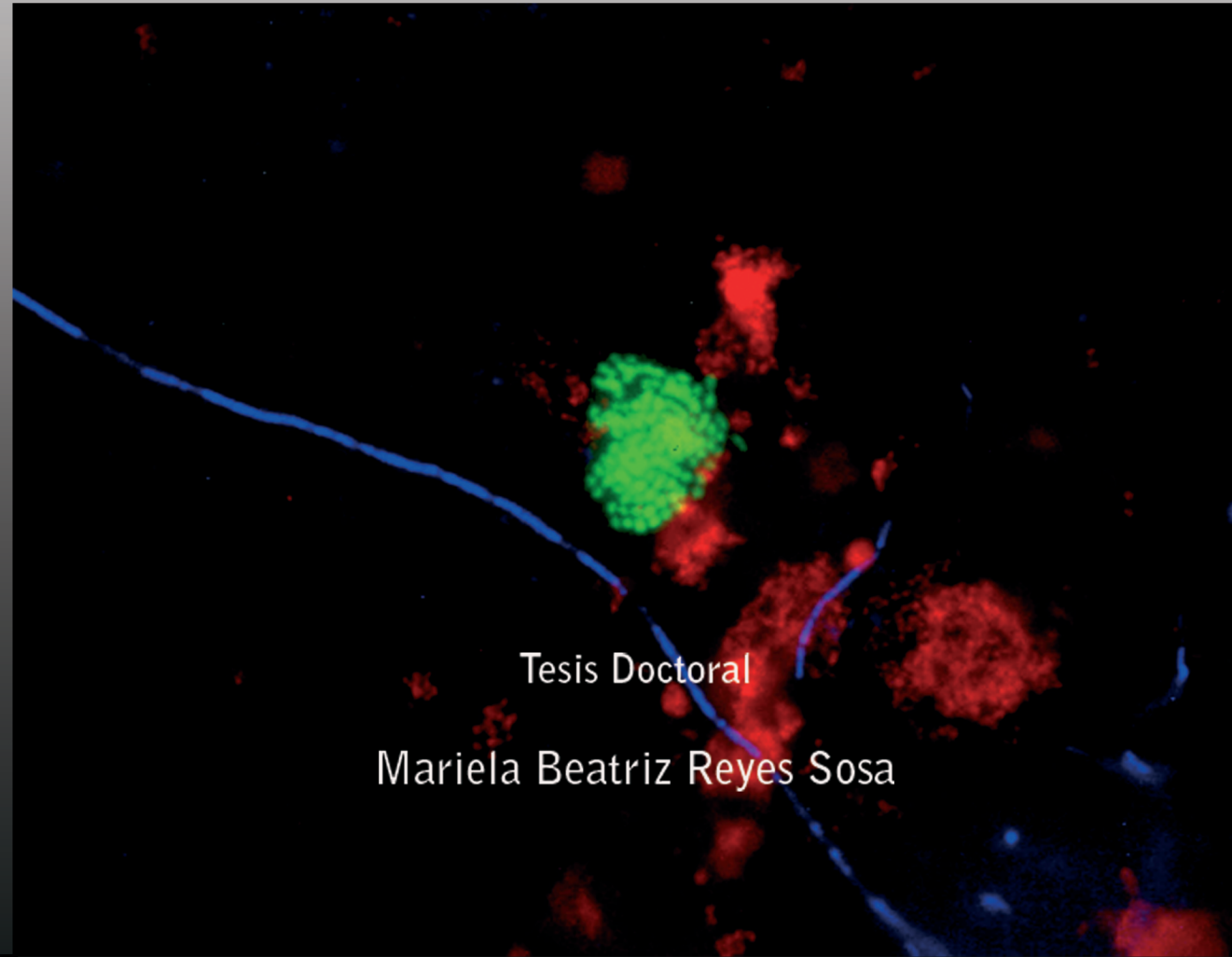




Estudio de las poblaciones bacterianas y su relación con los parámetros físico-químicos del tratamiento de aguas residuales

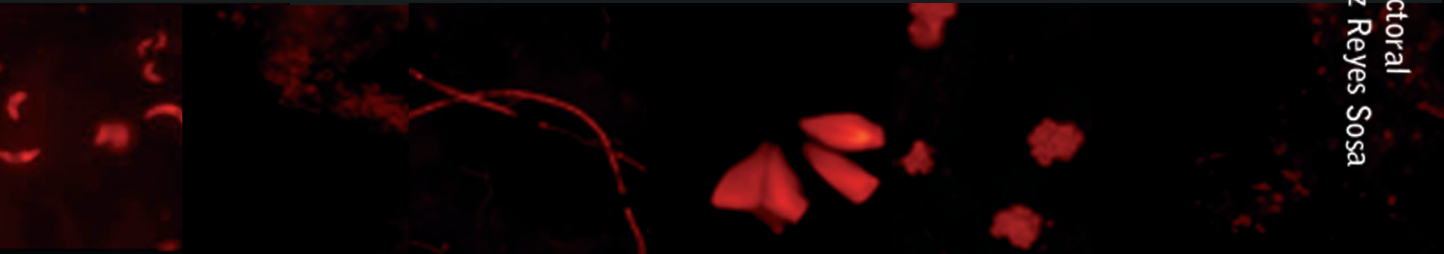
Estudio de las poblaciones bacterianas y su relación con los parámetros físicos-químicos del tratamiento de aguas residuales

Tesis Doctoral
Mariela Beatriz Reyes Sosa



Tesis Doctoral
Mariela Beatriz Reyes Sosa

Directores
José Luis Alonso Molina
Luis Borrás Falomir



Universidad Politécnica de Valencia

Departamento de Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente



Tesis Doctoral

Estudio de las poblaciones bacterianas y su relación con los parámetros físico-químicos del tratamiento de aguas residuales

Memorias que, para optar por el grado de doctor por la Universidad Politécnica de Valencia, presenta Mariela Beatriz Reyes Sosa

Valencia, Septiembre de 2014.

El investigador que no sabe que está buscando
no comprenderá lo que encuentre...
Claude Bernard

Agradecimientos

Ante todo agradezco a mis directores José Luis Alonso y a Luis Bórras por su tiempo, dedicación y paciencia que me han tenido a lo largo de este trabajo.

A Inma Amoros y Yolanda Moreno por toda su ayuda y enseñanzas en el laboratorio fuera del tema de la tesis. Inma no puedo dejar de mencionar mi gratitud por enseñarme el buen camino.

A mis compañeros y amigos inseparables del laboratorio Paula Santiago, Laura Moreno y Julián Fernández por todos esos momentos que teníamos para bajar el estrés.

A Josemi y Liz Alvendaño que aunque pronto acabaron su trabajo en el laboratorio siempre han estado pendiente echándome ánimos.

A todos los demás miembros del laboratorio que sin su presencia las horas en el laboratorio se harían más pesadas de lo que son. Andrés por compartir tus experiencias profesionales así como tu apoyo y colaboración para la realización de este trabajo.

A Rafael Romero por su ayuda y contribución en la parte estadística.

A mis grandes amigas Alicia Pineda, Nuria Borda, Rosa Mayo, Gema Jiménez, Mónica Jara, a mis amigos Rodrigo Cortes, Sandro Andújar, Moritz Blume, Roberto Lugo, que siempre han estado animándome sobre todo en los momentos de bajón.

A Jesús López que este último año ha sido un gran apoyo. A mi familia que a pesar de la presión para que me regrese pronto, siempre me animan a seguir en lo que quiero. A Enrique Sauri que desde el principio de mi decisión por el doctorado he contado con su apoyo incondicional.

A todos mis amigos en general que me han soportado a lo largo de este camino y que están pendientes de los pormenores y deseaban que terminase la tesis.

Abreviaturas

ACC	Análisis de Correspondencia Canónica
AOA	Arqueas oxidadoras de Amonio (<i>Ammonia Oxidizing Archaea</i>)
AOB	Bacterias oxidadoras de Amonio (<i>Ammonia Oxidizing Bacteria</i>)
ARU	Aguas residuales urbanas
CCorA	Análisis de correlación canónica (<i>Correspondence Correlation Analysis</i>)
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
Cm	carga másica
Cond	Conductividad
DGGE	Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>)
DBO	Demanda Bioquímica de Oxígeno
DNA	Acido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DQO	Demanda Química de Oxígeno
DQOT	Demanda Química de Oxígeno total
EBPR	Eliminación biológica de fósforo (<i>Enhanced Biological Phosphorus Removal</i>)
EDAR	Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales
EF	Edad de Fango
EPSAR	Entidad Pública de Saneamiento de Aguas Residuales
FAB	Bacterias acidogénicas fermentativas (<i>Fermentative Acidogenic Bacteria</i>)
FISH	Hibridación Florescente in situ (<i>Fluorescent in situ Hybridization</i>)
GAO	Bacterias acumuladoras de glucógeno (<i>Glycogen Accumulating Organisms</i>)
LPS	Lipopolisacárido
LTA	Ácidos lipoteicoicos
MAR-FISH	<i>Microautoradiography Fluorescent in situ Hybridization</i>
MBR	Bioreactor de membrana (<i>Membrane Bioreactor</i>)
NAG	N-acetilglucosamina
NAM	N-acetilmurámico
NAT	N-acetiltalosaminurónico
NCTC	Colección nacional de cultivos tipo (<i>National Collection of Type Cultures</i>)
NOB	Bacterias oxidadoras de nitrato (<i>Nitrate Oxidizing Bacteria</i>)
NT	Nitrógeno total
P	Fósforo
OD	Oxígeno Disuelto
PAO	Bacterias acumuladoras de poli-fosfatos (<i>Polyphosphate Accumulating Organisms</i>)
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFA	Paraformaldehído
PHA	Poli-Hidroxi-Alcanoatos
PHB	Poli-Hidroxi-Butiratos
PT	Fósforo Total
Q	Caudal
RGB	Rojo-verde-azul (<i>Reed-Green-Blue</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
S	Unidad de masa Svedberg
SDS	Sodio Dodecil Sulfato
SRB	Bacterias sulfato reductoras (<i>Sulfate Reducing Bacteria</i>)
SS	Sólidos Suspendidos

SSCP	Polimorfismo conformacional de cadena sencilla (<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>)
SSU	Subunidad pequeña del ribosoma bacteriano (<i>Small Subunit</i>)
SSV	Sólidos Suspendidos Volátiles
TFO	Bacterias formadoras de tétradas (<i>Tetrad Forming Organisms</i>)
T-RFLP	Electroforesis en gel con gradient de temperature (<i>Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
TRH	Tiempo de Retención Hidráulico
UV	Ultravioleta
VFA	Ácido graso volátil (<i>Volatile Fatty Acid</i>)

Resumen

Uno de los procesos más utilizados en el tratamiento de aguas residuales es el de fangos activos en sus distintas modalidades. La compleja comunidad de microorganismos que participan en los procesos de fangos activos es su principal característica para llevar a cabo con éxito la depuración del agua. A pesar de los muchos estudios realizados para conocer la comunidad de bacterias que integran el proceso de fangos activos falta mucho por conocer de la estructura y dinámica de la población.

El conocimiento de la población microbiana y de sus posibles relaciones con los parámetros operacionales de la EDAR (Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales) puede contribuir en gran medida a la optimización de los procesos implicados y por tanto repercutir de forma importante en los costes de operación.

En el presente trabajo se planteó el objetivo de detectar mediante la técnica molecular de hibridación in situ con sondas 16S rDNA marcadas con fluoróforos (FISH) la población de bacterias y arqueas que está presente en un reactor de aireación continua de fangos activos.

La detección se realizó a nivel taxonómico de phylum y clase de bacterias y arqueas, así como a nivel de grupos funcionales: como las bacterias nitrificantes, desnitrificantes, acumuladoras de fósforo, acumuladoras de glucógeno, metanotrofas, sulfato reductoras y metanogénicas. Se detectó un promedio del 80% del total de población presente en las muestras a nivel de phylum y clases. La población de *Proteobacteria* de la clase β -*Proteobacteria* fue la dominante a lo largo del muestreo, seguidas de la clase α -*Proteobacteria* y γ -*Proteobacteria*. A nivel de grupos funcionales se detectó menos del 50% de la población presente, siendo el grupo dominante entre los estudiados las bacterias sulfato reductoras, seguidas de las bacterias desnitrificantes. También se detectó presencia de arqueas metanogénicas y arqueas oxidantes de amonio.

Al trabajar con FISH es importante considerar la complejidad de detección simultánea de las células Gram negativas y Gram positivas. El método de fijación variará con las diferencias estructurales a nivel de membrana, así como con el tipo de muestra a analizar.

Por otra parte, también se ha detectado con FISH formas helicoidales, posiblemente ascóporas del phylum *Ascomycota*, con actividad enzimática glucoronidasa y fosfatasa. Los ascomicetos son saprofitos descomponedores y pueden contribuir en el proceso de depuración, aunque no se ha establecido todavía su capacidad de degradación de materia orgánica en un proceso de fangos activos.

La diversidad de la comunidad de organismos en el proceso de fangos activos depende de las características de las aguas a tratar, de los parámetros operacionales como oxígeno disuelto y edad de fango entre otros y de los parámetros físico-químicos.

En este trabajo se estudió la variabilidad de la comunidad de bacterias y arqueas durante un año. Las muestras se tomaron en el reactor biológico de la EDAR del Carraixet con una frecuencia de muestreo quincenal. Mediante la aplicación de diversos estadísticos como: CCorA (análisis de correlación canónica); AC (análisis de correspondencia) y ACC (análisis de correspondencia canónica), se obtuvo las relaciones de cada población presente en las muestras con los parámetros operacionales y físico-químicos del licor mezcla.

La abundancia de las bacterias y arqueas por grupo taxonómico (phylum y clase) presentaron una relación más alta con las variables operacionales, mientras que la abundancia por grupo funcionales dieron una relación más elevada con las variables físico-químicas.

Las relaciones entre la población de protozoos y la población de bacterias y arqueas fueron estudiadas mediante análisis multivariante. El resultado fue que existe relación entre algunas comunidades de protozoos y algunas bacterias o arqueas, lo que indicaría que pueden compartir características de hábitat.

En general, en sistemas de fangos activos con aireación continua las variables operacionales y físico-químicas del licor mezcla juegan un papel importante en la dinámica poblacional de las bacterias y arqueas.

Resum

Un dels processos més utilitzats en el tractament d'aigües residuals és el de fangs activats en les diferents modalitats. La complexa comunitat de microorganismes que participen en els processos de fangs actius és la seva principal característica per dur a terme amb èxit la depuració de l'aigua. Malgrat els molts estudis realitzats per conèixer la comunitat de bacteris que integren el procés de fangs actius falta molt per conèixer de l'estructura i dinàmica de la població.

El coneixement de la població microbiana i de les seves possibles relacions amb els paràmetres operacionals de l'EDAR pot contribuir en gran mesura a l'optimització dels processos implicats i per tant repercutir de forma important en els costos d'operació.

En el present treball es va plantejar l'objectiu de detectar mitjançant la tècnica molecular d'hibridació in situ amb sondes 16S rDNA marcades amb fluoròfors (FISH) la població de bacteris i arqueobacteris que està present en un reactor de ventilació contínua de fangs actius.

La detecció es va realitzar a nivell taxonòmic de phylum i classe de bacteris i arqueobacteris, així com a nivell de grups funcionals: com els bacteris nitrificants, desnitrificants, acumuladors de fòsfor, acumuladors de glucogen, metanòtrofs, sulfat reductors i metanogènics. Es va detectar una mitjana del 80% del total de població present a les mostres a nivell de phylum i classes. La població de *Proteobacteria* de la classe β -*Proteobacteria* va ser la dominant al llarg del mostreig, seguides de la classe α -*Proteobacteria* i γ -*Proteobacteria*. A nivell de grups funcionals es va detectar menys del 50% de la població present, sent el grup dominant entre els estudiats els bacteris sulfat reductores, seguides dels bacteris desnitrificants. També es va detectar presència de arqueobacteris metanogènics i arqueobacteris oxidants d'amoni.

En treballar amb FISH és important considerar la complexitat de detecció simultània de les cèl·lules Gram negatiu i Gram positiu. El mètode de fixació variarà amb les diferències estructurals a nivell de membrana, així com amb el tipus de mostra a analitzar.

D'altra banda, també s'ha detectat amb FISH formes helicoidals, possiblement ascòpores del phylum *Ascomycota*, amb activitat enzimàtica glucoronidasa i fosfatasa. Els ascomicets són sapròfits descomponedors i poden contribuir en el procés de depuració, encara que no s'ha establert la seva capacitat de degradació de matèria orgànica en un procés de fangs actius.

La diversitat de la comunitat d'organismes en el procés de fangs actius depèn de les característiques de les aigües a tractar, dels paràmetres operacionals com oxigen dissolt i edat de fang entre d'altres i dels paràmetres fisicoquímics. En aquest treball es va estudiar la variabilitat de la comunitat de bacteris i arqueobacteris durant un any. Les mostres es van prendre en el reactor biològic de l'EDAR del Carraixet amb una

frequència de mostreig quinzenal. Mitjançant l'aplicació de diversos estadístics com: CCor A (anàlisi de correlació canònica); AC (anàlisi de correspondència) i ACC (anàlisi de correspondència canònica), es va obtenir les relacions de cada població present a les mostres amb els paràmetres operacionals i fisicoquímics del licor mescla.

La abundància dels bacteris i arqueobacteris per grup taxonòmic (phylum i classe) va presentar una relació més alta amb les variables operacionals, mentre que la abundància per grup funcionals va donar una relació més elevada amb les variables fisicoquímiques.

Les relacions entre la població de protozous i la població de bacteris i arqueobacteris van ser estudiades mitjançant anàlisi multivariant. El resultat va ser que hi ha relació entre algunes comunitats de protozoos i alguns bacteris o arqueobacteris, el que indicaria que poden compartir característiques d'hàbitat.

En general, en sistemes de fangs actius amb ventilació contínua, les variables operacionals i fisicoquímiques del licor mescla tenen un paper important en la dinàmica poblacional dels bacteris i arqueobacteris.

Abstract

Activated sludge, in its various forms, is one of the most widely used wastewater treatment processes. The main feature to successfully perform the wastewater purification is the complex community of microorganisms involved in the activated sludge process. Despite the numerous studies conducted to know the community of bacteria in the activated sludge, the structure and population dynamics are not completely understood.

Knowledge of the microbial population and their possible relationships with the operational parameters of the wastewater treatment plant (WWTP) can greatly contribute to the optimization of the processes involved and therefore have an important impact on operating costs.

In this study, detection of bacteria and archaea populations present in a continuous aeration activated sludge reactor has been assessed using a molecular technique, fluorescence in situ hybridization with 16S rDNA probes labeled with fluorophores (FISH).

Bacteria and archaea were studied at phylum and class level. Other bacteria such as nitrifying bacteria, denitrifying bacteria, phosphorus accumulating organisms, glycogen accumulating organisms, methanotrophic bacteria, sulfate-reducing and methanogenic organisms were studied at functional groups level. An average of 80% of the total population present in the samples at the level of phylum and classes was detected. *β-Proteobacteria* class of the phylum *Proteobacteria* was the dominant during the sampling, followed by *α-Proteobacteria* and *γ-Proteobacteria* classes. At the level of functional groups, it has been detected less than 50% of this population, being the dominant group the sulfate-reducing bacteria, followed by denitrifying bacteria. Presence of methanogenic archaea and ammonia oxidizing archaea was also detected.

When working with FISH technique the complexity of simultaneous detection of Gram negative and Gram positive cells is an important issue. The fixation method depends on the structural differences at membrane level and the type of sample being tested.

Moreover ellipsoidal shapes, possibly ascospores of the phylum *Ascomycota*, with glucuronidase and phosphatase enzyme activity, have been also detected by FISH. *Ascomycetes* are saprophytic decomposers and can contribute to the treatment process, but its capacity to degrade organic matter in the activated sludge process has not been yet established.

The diversity of the community of organisms in the activated sludge process depends on the characteristics of the water to be treated, the operational parameters (such as dissolved oxygen, sludge age and others) and physicochemical parameters. In this study, the dynamic community of bacteria and archaea was studied during one year. Samples were taken from the biological reactor of the Carraixet WWTP with a bi-

weekly sampling frequency. Different multivariate analysis were carried out such as CCorA (canonical correlation analysis); CA (correspondence analysis) and CCA (canonical correspondence analysis), to study the relations of each population present in the samples with the physico-chemical and operational parameters.

Bacteria and archaea abundance by taxonomic group (phylum, class) was higher related to operational variables, while functional groups abundance were higher related to the physico-chemical variables.

Relationships between protozoa population, bacteria population and archaea were studied by multivariate analysis. Results showed a relationship between some protozoa communities and some bacteria or archaea, indicating that they can share habitat characteristics.

In general in activated sludge systems with continuous aeration, operational and physical-chemical variables of mixed liquor play an important role in the population dynamics of bacteria and archaea.

Índice

1	INTRODUCCIÓN	3
1.1	CARACTERÍSTICAS TÍPICAS DE LAS AGUAS RESIDUALES	4
1.2	PROCESOS BIOLÓGICOS EN AGUAS RESIDUALES	4
1.3	ORGANISMOS PROCARIOTA Y EUCARIOTA.....	6
1.3.1	Clasificación Microbiana.....	8
1.4	DOMINIO ARQUEA	9
1.4.1	Phylum <i>Crenarchaeota</i>	12
1.4.2	Phylum <i>Euryarchaeota</i>	13
1.5	DOMINIO BACTERIA	21
1.5.1	Phylum bacterianos.....	25
1.5.2	Grupos Funcionales Bacterianos	43
1.5.3	Bacterias acumuladoras de poli-fosfatos (PAO).....	48
1.5.4	Bacterias acumuladoras de glucógeno (GAO).....	51
1.5.5	Bacterias acidogénicas/acetogénicas	53
1.5.6	Organismos metanotróficos	57
1.5.7	Bacterias Sulfato Reductoras (SRB).....	58
1.6	DOMINIO EUCARIOTA	65
1.7	IMPORTANCIA DE IDENTIFICAR LOS MICROORGANISMOS EN LOS TRATAMIENTOS DE LAS AGUAS	66
1.8	TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS. HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> (FISH).....	67
1.8.1	Fijación de la biomasa para la hibridación	76
1.8.2	Sondas.....	79
2	OBJETIVOS	83
3	MATERIALES Y MÉTODOS	87
3.1	MATERIALES Y MÉTODOS.....	87
3.1.1	Procedencia de la muestra.....	87
3.1.2	Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	88
3.2	PROCEDIMIENTO	89
3.2.1	Sondas.....	92
3.2.2	Cuantificación de los microorganismos.....	96
3.2.3	Problemas asociados con la detección de la fluorescencia	99
3.3	PRETRATAMIENTO ENZIMÁTICO.....	100
3.4	ANÁLISIS DE LA FIGURA DE LA SEÑAL DE HIBRIDACIÓN.....	101
3.4.1	Análisis estadístico de las medidas de intensidad de la señal	102
3.5	IDENTIFICACIÓN Y RECUENTO DE PROTOZOOS	103
3.6	PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	103
3.6.1	Fijación formas media luna para determinar la actividad Fosfatasa	104
3.6.2	Fijación formas media luna para determinar la actividad Glucuronidasa	104
3.6.3	Tinción Neisser (Eikelboom y van Buijsen, 1981)	105
3.6.4	Observación al microscopio.....	105
3.6.5	Doble tinción para gránulos intracelulares de polifosfato (Poli P) y polihidroxibutirato (PHB)	105
3.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	107

4	RESULTADOS.....	117
4.1	PERMEABILIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LAS MUESTRAS.....	117
4.2	IDENTIFICACIÓN Y VARIACIÓN DE LA POBLACIÓN DE ARQUEAS	125
	4.2.1 Identificación y cuantificación de los diversos grupos funcionales del dominio <i>Archaea</i>	126
4.3	IDENTIFICACIÓN Y VARIACIÓN DE LA POBLACIÓN DE BACTERIAS.....	132
	4.3.1 Identificación y cuantificación de los diversos grupos funcionales del dominio Bacteria....	146
4.4	DINÁMICA POBLACIONAL EN CADA LÍNEA DE LA EDAR.	162
4.5	IDENTIFICACIÓN DEL DOMINIO EUCARIOTA	170
4.6	ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LAS RELACIONES ENTRE BACTERIAS Y ARQUEAS CON LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS, OPERACIONALES Y PROTOZOOS.....	173
5	DISCUSIÓN.....	217
6	CONCLUSIONES.....	233
7	BIBLIOGRAFÍA.....	237
8	ANEXOS	

Índice de Figuras

Figura 1. División de los seres vivos.	6
Figura 2. Unión de los lípidos con el glicerol.	8
Figura 3. Secuencia RNA ribosómico de <i>Escherichia coli</i>	9
Figura 4. Reacciones por la vía acetil-CoA de las metanogénicas.	10
Figura 5. Subdivisiones del dominio Arquea.	11
Figura 6. Posible relación dominio/actividad de la comunidad AOA.	13
Figura 7. Arqueas metanogénicas. A) Arqueas <i>methanosarciales</i> en una muestra de digester anaerobio en la EDAR Carraixet.	14
Figura 8. Clasificación de las sondas metanogénicas en relación con las bacterias metanogénicas que hibridan.	18
Figura 9. Sustratos de las metanogénicas.	19
Figura 10. Reacciones llevadas a cabo en los fangos activos.	22
Figura 11. Subdivisión del dominio Bacteria.	23
Figura 12. Secuencias halladas en muestras de fangos activos con proceso de nitrificación.	24
Figura 13. <i>Cloroflexi</i> encontradas con FISH en un reactor a escala de laboratorio con las sondas CFX1223 y GNSB941.	26
Figura 14. Organismos <i>Nitrospira</i> encontrados en aguas residuales con MAR-FISH.	28
Figura 15. <i>Alphaproteobacteria</i> encontradas con FISH en muestras de un reactor MBR. Las células en verde bacterias hibridadas con EUBmix.	30
Figura 16. <i>Betaproteobacteria</i> encontradas con FISH en un proceso EBPR.	31
Figura 17. <i>Gammaproteobacteris</i> en muestra de un reactor desnitrificante.	32
Figura 18. <i>Deltaproteobacteria</i> en un digester anaerobio.	33
Figura 19. <i>Epsilonbacteria</i> en aguas residuales.	34
Figura 20. <i>Firmicutes</i> en una biopelícula de un reactor anaerobio. Figura capturada con un microscopio confocal de fluorescencia.	37
Figura 21. <i>Actinobacteria</i> en fangos activos con proceso de eliminación de fósforo.	39
Figura 22. <i>Planctomycetes</i> en fangos activos aerobios.	41
Figura 23. Colonia de <i>Acidobacteria</i> en una muestra extraída en un acuífero en EEUU.	42
Figura 24. Diagrama de la técnica DGGE.	68
Figura 25. Diagrama de la técnica T-RFLP.	69
Figura 26. Diagrama de la técnica SSCP.	70
Figura 27. Diagrama de la técnica PCR.	71
Figura 28. Esquema de la hibridación fluorescente in situ FISH.	74
Figura 29. Composición de la comunidad bacteriana en diversas EDAR por análisis semi- cuantitativo FISH.	75
Figura 30. Composición de la comunidad de bacterias en una EDAR in Skagen Dinamarca, usando las sondas FISH.	75
Figura 31. Estructura de la pared celular de las bacterias Gram positivas.	76
Figura 32. Estructura de la pared celular de las bacterias Gram negativas.	77
Figura 33. Representación esquemática de los peptidoglicanos.	78
Figura 34. Peptidoglicano de la pared celular de arquea.	79
Figura 35. Esquema de la EDAR del Carraixet (EPSAR).	88
Figura 36. Descomposición a escala de grises por el MATLAB.	98
Figura 37. Hoja de cálculo que genera el programa de cuantificación.	99
Figura 38. Actinobacterias hibridadas durante la prueba de tratamiento enzimático.	119
Figura 39. Variación de la población de arqueas durante el muestreo.	125
Figura 40. Arqueas en fangos activos de la EDAR del Carraixet.	126
Figura 41. Arqueas oxidadoras de amonio (AOA) <i>Nitrosopumilus maritimus</i> en fangos activos de la EDAR del Carraixet.	127
Figura 42. Variación poblacional de las arqueas metanogénicas en la línea 1.	128
Figura 43. Variación poblacional de las arqueas metanogénicas durante el muestreo en la línea 2.	129

Figura 44. Arqueas <i>Methanosarciales</i> en fangos activos de la EDAR del Carraixet.	130
Figura 45. Arqueas <i>Methanomicrobiales</i> hibridadas con la sonda MG1200b en fangos activos de la EDAR del Carraixet.	131
Figura 46. Arqueas <i>Methanobacterales</i> hibridadas con la sonda MB311 en fangos activos de la EDAR del Carraixet.	131
Figura 47. <i>Firmicutes</i> presentes en las muestras de la EDAR del Carraixet.	133
Figura48. <i>Actinobacterias</i> presentes en la muestras de la EDAR del Carraixet.	133
Figura49. Células del phylum <i>Bacteroidetes</i> en las muestras de la EDAR del Carraixet. Hibridadas con la sonda CF319b.	134
Figura50. <i>Acidobacterias</i> presentes en las muestras de la EDAR del Carraixet hibridadas con la sonda SS_HOL1400.	135
Figura51. Dinámica poblacional de las bacterias <i>Chloroflexi</i> en las líneas 1 y 2 de la EDAR del Carraixet.	136
Figura52. Bacterias del phylum <i>Chloroflexi</i> en flóculos de la EDAR del Carraixet.	137
Figura53. Variación de la población de <i>α-Proteobacteria</i> en la EDAR del Carraxeit.	138
Figura54. <i>α-Proteobacteria</i> en la EDAR del Carraixet.	139
Figura55. Variación de la población <i>β-Proteobacteria</i> en la EDAR del Carraixet.	140
Figura56. <i>β-Proteobacteria</i> en la EDAR del Carraixet.	141
Figura57. Variación de la población de <i>γ-Proteobacteria</i> en la EDAR del Carrixet.	142
Figura58. <i>γ-Proteobacteria</i> en la EDAR del Carraixet.	142
Figura59. Cocobacilos <i>γ-Proteobacteria</i> presentes en la EDAR del Carraixet.	143
Figura 60. Variación de la población de <i>δ-Proteobacteria</i> en la EDAR del Carraixet.	144
Figura61. <i>δ-Proteobacteria</i> en fangos activos de la EDAR del Carraixet.	144
Figura62. Variación de la población de <i>Planctomycetes</i> en fangos <i>activos de la EDAR</i> del Carraixet.	145
Figura63. <i>Planctomycetes</i> en fangos activos en la EDAR del Carraixet.	146
Figura64. Variación de la población de AOB en fangos activos de la EDAR del Carraixet.	147
Figura65. AOB presentes en los fangos activos de la EDAR del Carraixet.	147
Figura 66. Variación en el tiempo del phylum <i>Nitrospira</i> en la EDAR del Carraixet.	148
Figura67. Células de <i>Nitrospira</i> en los flóculos de la EDAR del Carraixet.	149
Figura68. Variación de las bacterias Desnitrificantes <i>Azoarcus-Thauera</i> en los fangos activos de la EDAR del Carraixet.	150
Figura69. <i>Azoarcus -Thauera</i> presentes en fangos activos en la EDAR del Carraixet.	151
Figura70. <i>Paracoccus</i> presente en los fangos activos de la EDAR del Carraixet.	151
Figura71. Variación de las PAO en la EDAR del Carraixet.	152
Figura72. PAO presentes en fangos activos en la EDAR del Carraixet.	153
Figura 73. Variación de la población de GAO en la EDAR del Carraixet.	154
Figura 74. GAO presentes en fangos activos en la EDAR del Carraixet.	155
Figura 75. Metanotrofas <i>cluster</i> Tipo 1 en fangos activos en la EDAR del Carraixet.	155
Figura 76. Metanotrofas <i>cluster</i> tipo 2 presentes en fangos activos en la EDAR del Carraixet.	156
Figura 77. SRB presentes en los fangos activos de la EDAR del Carraixet.	157
Figura 78. Variación de la población de <i>Desulfonema</i> en la EDAR del Carraixet.	158
Figura 79. Variación de las SRB hibridadas con la sonda SRB385 en fangos activos en la EDAR del Carraixet.	159
Figura 80. Variación de las SRB hibridadas con la sonda SRB385Db en fangos activos en la EDAR del Carraixet.	160
Figura 81. SRB <i>Desulfonema</i> presentes en fangos activos en la EDAR del Carraixet.	161
Figura 82. SRB presentes en fangos activos en la EDAR del Carraixet.	162
Figura 83. SRB presentes en fangos activos en la EDAR del Carraixet.	162
Figura 84. Dinámica poblacional en la línea 1 de la EDAR del Carraixet.	163
Figura 85. Dinámica poblacional en la línea 2 de la EDAR del Carraixet.	164
Figura 86. Dinámica poblacional de los grupos funcionales en la línea 1 de la EDAR del Carraixet.	168
Figura 87. Dinámica poblacional de los grupos funcionales en la línea 2 de la EDAR del Carraixet.	169
Figura 88. Esporas de hongos encontradas en la EDAR del Carraixet.	172

Figura 89. Acumulación de PHB de las esporas de hongos en forma de media luna.	173
Figura 90. Formas elipsoidales con actividad Glucuronidasa y Fosfatasa.	173
Figura 91. Gráfico de las correlaciones Canónicas entre bacterias, arqueas y variables operacionales. ..	175
Figura 92. Análisis de correspondencia entre los phylum y las variables operacionales.	177
Figura 93. Análisis de correspondencia canónico de las comunidades de bacterias y arqueas con las variables operacionales.	178
Figura 94. Gráfico de las correlaciones Canónicas entre bacterias, arqueas y variables físico-químicas.	181
Figura 95. Análisis de correspondencia para las comunidades de bacterias y arqueas y variables físico-químicas.	183
Figura 96. Biplot de las comunidades de bacterias y arqueas con contribución a las columnas.	184
Figura 97. Análisis de correspondencia canónica para las comunidades de bacterias y arqueas con las variables físico-químicas.	185
Figura 98. Gráfico de las correlaciones Canónicas entre las poblaciones de los grupos funcionales y las variables operacionales.	187
Figura 99. Análisis de correspondencia de los grupos funcionales y las variables operacionales.	188
Figura 100. Análisis de correspondencia Canónico de los grupos funcionales y las variables operacionales.	190
Figura 101. Gráfico de las correlaciones canónicas entre los grupos funcionales y las variables físico-químicas.	192
Figura 102. Análisis de correspondencia de los grupos funcionales y las variables físico-químicas.	193
Figura 103. Análisis de correspondencia canónica de los grupos funcionales y las variables físico-químicas.	194
Figura 104. Análisis de correspondencia canónica entre las comunidades de bacterias, arqueas y los protozoos flagelados, sarcodinos y carnívoros.	201
Figura 105. Análisis de correspondencia canónica entre las comunidades de bacterias, arqueas y el los protozoos bacterívoros.	202
Figura 106. Análisis de correspondencia canónica entre las comunidades de bacterias, arqueas los protozoos sésiles.	202
Figura 107. Análisis de correspondencia canónica entre los grupos funcionales de bacterias, arqueas y protozoos flagelados, sarcodinos y carnívoros.	209
Figura 108. Análisis de correspondencia canónica entre los grupos funcionales de bacterias, arqueas y protozoos bacterívoros.	209
Figura 109. Análisis de correspondencia canónica entre los grupos funcionales de bacterias, arqueas y protozoos sésiles.	210

Índice de Tablas

Tabla 1. Grupos nutricionales de las arqueas metanogénicas.....	20
Tabla 2. Bacterias acidogénicas hidrolíticas de la digestión Anaerobia.....	54
Tabla 3. Bacterias acidogénicas fermentativas de la digestión anaerobia.....	55
Tabla 4. Bacterias acetogénicas sintróficas obligatorias de la digestión anaerobia.....	56
Tabla 5. Cantidades de formamida y agua para la preparación de la solución de hibridación.....	91
Tabla 6. Cantidades de NaCl para la solución de lavado.....	92
Tabla 7. Sondas generales.....	93
Tabla 8. Sondas para las Arqueas.....	93
Tabla 9. Sondas para cada phylum bacteriano.....	94
Tabla 10. Sondas usadas para la detección de los grupos funcionales.....	95
Tabla 11. Sondas para la detección de Eucaryota.....	96
Tabla 12. Datos operacionales de la línea 1.....	107
Tabla 13. Datos operacionales de la línea 2.....	108
Tabla 14. Datos Físico-químicos de la línea 1.....	109
Tabla 15. Datos Físico-químicos de la línea 2.....	110
Tabla 16. Prueba de permeabilización enzimática.....	118
Tabla 17. Células control en la prueba de tratamiento enzimático.....	118
Tabla 18. Cepas control del phylum <i>Firmicutes</i>	121
Tabla 19. Resultados hibridación cepas control <i>Firmicutes</i>	121
Tabla 20. Resultados prueba fijación cultivos puros + hibridación con y sin tratamiento enzimático.....	122
Tabla 21. Cepas control para prueba lisis celular por lisozima.....	123
Tabla 22. Resultado de lisis celular por lisozima.....	124
Tabla 23. Cepas control de bacterias.....	132
Tabla 24. Promedio de las poblaciones más representativas en la EDAR del Carraixet.....	167
Tabla 25. Promedios de la población de Protozoos.....	171
Tabla 26. Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas.....	174
Tabla 27. Partición de la inercia explicada.....	178
Tabla 28. Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas.....	180
Tabla 29. Partición de la inercia explicada.....	184
Tabla 30. Correlaciones entre las variables de entrada y variables canónicas.....	186
Tabla 31. Partición de la inercia explicada.....	189
Tabla 32. Correlación entre variables de entrada y variables canónicas.....	191
Tabla 33. Partición de la inercia explicada.....	194
Tabla 34. Grupos de los datos biológicos para estadísticos.....	196
Tabla 35. Correlaciones de los factores canónicos y las variables de las comunidades de bacterias y arqueas junto con los grupos de flagelados, sarcodinos y carnívoros.....	197
Tabla 36. Correlaciones de los factores canónicos con las variables de las comunidades de bacterias y arqueas junto con la del grupo bacterívoros.....	198
Tabla 37. Correlaciones entre los factores canónicos y las variables de las comunidades de bacterias y arqueas junto con el grupo de bacterívoros sésiles.....	199
Tabla 38. Correlaciones entre los factores canónicos y las variables de las comunidades de bacterias y arqueas junto con el grupo micrometazoos.....	200
Tabla 39. Correlaciones entre los factores canónicos y los grupos funcionales de bacterias y arqueas y los protozoos flagelados, sarcodinos y carnívoros.....	205
Tabla 40. Correlaciones entre los factores canónicos y los grupos funcionales de bacterias, arqueas y los protozoos bacterívoros nadadores, reptantes y omnívoros.....	206
Tabla 41. Correlación entre los factores canónicos y los grupos funcionales de bacterias, arqueas y los protozoos sésiles.....	207
Tabla 42. Correlación de los factores canónicos y los grupos funcionales de bacterias, arqueas y los micrometazoos.....	208

Introducción

1 Introducción

El aumento de la población mundial y de las necesidades surgidas del desarrollo económico y la explotación demográfica, ha ocasionado que el agua sea un recurso natural cada vez más escaso.

La contaminación del agua empieza desde que precipita en forma de lluvia arrastrando impurezas del aire. Al llegar a la superficie de la tierra se le añade otros contaminantes generados por el hombre, ya sea por la actividad agrícola, ganadera o industrial. Todo esto hace sobrepasar el poder de autodepuración de la naturaleza, haciendo necesario tomar medidas para mitigar el problema de la contaminación del agua. Estas medidas consisten en llevar a cabo tratamientos físicos, químicos y biológicos para depurar las aguas contaminadas generadas por las actividad humana.

A las aguas contaminadas por las actividades del hombre se les denomina aguas residuales. Las aguas residuales son el líquido recogido mediante la red de alcantarillado para su envío a una planta de depuración (Mujeriego, 1990).

Se considera agua residual al agua proveniente de las zonas habitadas y que son generadas principalmente por el desarrollo humano y las actividades comerciales o domésticas de limpieza y alimentación (Barajas López, 2002).

Las aguas residuales urbanas (ARU), son generadas cuando dentro de la misma red de alcantarillado que transporta el agua proveniente de las zonas habitadas, se vierte aguas residuales de origen industrial. Estas últimas provienen de las instalaciones de manufacturado y elaboración de alimentos. Así mismo las ARU pueden contener aguas de escorrentía que acceden a la red de alcantarillado a través de los pozos de registro y aguas subterráneas que se infiltran en la red a través de uniones deterioradas o de grietas en las conducciones (Barajas López, 2002).

En las últimas décadas se han desarrollado una gran variedad de procesos físicos, químicos y biológicos para el tratamiento de aguas residuales. Cada uno de ellos se caracteriza por una serie de limitaciones, eficiencia y costes económicos.

Los tratamientos físicos como la precipitación, la adsorción o el arrastre por corriente de gas, entre otros, transfieren los contaminantes del agua a una segunda fase, pero sin eliminarlos. Son, por tanto, procesos no destructivos. Los tratamientos químicos tales como la oxidación húmeda, la ozonización, la radiación UV o el empleo de agentes químicos oxidantes (como o peróxido de hidrógeno) actúan sobre aquellas moléculas susceptibles de oxidación. Son, por tanto, procesos no selectivos,

lo que eleva considerablemente los costes de implantación y de reactivos (Scott, R.J. and Ollis, D.F., 1995).

Los tratamientos biológicos son preferidos frente a los químicos siempre que sea posible, ya que tienen mayores rendimientos con menores costes económicos de explotación y mantenimiento, puesto que destruyen completamente los contaminantes, transformándolos en sustancias inocuas como el dióxido de carbono, el nitrógeno molecular, u otros subproductos como el metano. Los costes de inversión de los procesos biológicos son del orden de 5 a 20 veces menores que los químicos. A su vez, los costes de tratamiento son de 3 a 10 veces menores (Marco *et al.*, 1997).

1.1 Características típicas de las aguas residuales

La composición de un agua residual muestra un amplio margen de variación entre las diferentes poblaciones. Esto se debe no solo a las influencias de origen industrial, comercial y fluvial que pudiera presentar sino también a los usos públicos del agua en función de la naturaleza de la población residente.

En términos generales, la mayor parte de los componentes presentes en un agua residual son materia orgánica, nutrientes, sales metálicas, materia inorgánica y microorganismos. Una considerable parte de estos componentes se encuentran en forma particulada.

La diversidad en composición de las aguas residuales hace necesario la caracterización (analíticas) de las mismas, en especial cuando se desea definir estrategias de tratamiento y de aplicación de las tecnologías adecuadas para el cumplimiento de las normativas de vertidos existentes.

Los principales parámetros que se analizan tanto en las aguas de entrada como en las aguas de salida de las plantas de tratamiento son: SS (Sólidos suspendidos), SSV (Sólidos Suspendidos Volátiles), DBO (Demanda Bioquímica de Oxígeno), DQO (Demanda Química de Oxígeno), pH, nitrógeno y fósforo.

1.2 Procesos biológicos en aguas residuales

La materia orgánica que se encuentran en las aguas residuales, sufre cambios debido a la acción de los organismos que se encuentran en ellas.

Todos los procesos biológicos llevados a cabo en la depuración de las aguas contaminadas con materia orgánica biodegradable, se basan en el proceso natural de

autodepuración de las aguas y por tanto en los requerimientos nutricionales de los microorganismos (Catalán, 1997).

Los microorganismos en ausencia o presencia de oxígeno libre, descomponen la materia orgánica obteniendo la energía necesaria para sus necesidades metabólicas y para elaborar otros materiales que incorporan a sus propias células (Catalán, 1997).

El objetivo fundamental del tratamiento biológico de las aguas residuales con materia orgánica biodegradable es estabilizar dicha materia orgánica. La estabilización de la materia orgánica presente en el agua se realiza mediante la intervención de microorganismos, por lo que el éxito de éste tratamiento radicará en favorecer la proliferación de los mismos (Catalán, 1997).

Un tratamiento biológico ampliamente empleado en la depuración del agua el conocido como fangos activos. Este consiste en el desarrollo de un cultivo microbiano en un depósito agitado, aireado y alimentado con agua residual. Dicho cultivo es capaz de metabolizar como nutrientes la materia orgánica contaminante presente en el agua.

En los sistemas de fangos activos, junto con las aguas residuales son introducidas muchas especies de organismos. Muchas de las especies encuentran en los fangos activos un medio inadecuado y, como consecuencia de ello, mueren; otras en cambio se ven favorecidas de modo que persisten y se multiplican. La composición específica de los fangos activos estará determinada por la velocidad relativa de crecimiento de las especies, la disponibilidad de alimento en competición con otras especies del mismo nivel trófico y el efecto de la predación de los organismos de niveles tróficos más altos. Otros factores importantes son: la disponibilidad de oxígeno, el pH, la temperatura y la presencia de agentes inhibidores o tóxicos. De todas las especies de un mismo nivel trófico que compiten por el mismo alimento la más fuerte y mejor adaptada se convertirá en dominante. Esta situación debería conducir a la eliminación de las otras especies que compiten. Esto no ocurre debido a las condiciones cambiantes que se dan conforme los fangos pasan a través del sistema, lo que favorece sucesivamente a diferentes especies y a la introducción constante de una población microbiana mixta que mantiene la competencia por el alimento (Ferrer *et al.*, 2007).

Los principales microorganismos que se pueden encontrar en los sistemas de tratamiento de aguas residuales son: bacterias, arqueas, protozoos, algas, hongos, rotíferos y nemátodos (procariotas y eucariotas), siendo las bacterias las que constituyen el 95% de la biomasa en el proceso de fangos activos (Ferrer *et al.*, 2007).

1.3 Organismos Procariota y Eucariota

Antes de entrar en detalle sobre los microorganismos que encontramos en el proceso biológico de depuración las aguas residuales, se explicará en términos generales la clasificación taxonómica. Para ello se describirá la división y la evolución en la clasificación del árbol de la vida.

En 1925 (Chatton, E., 1925) se propuso una división de los seres vivos en organismos procariotas y eucariotas. Esta división no fue del todo aceptada, por lo que en 1969 (Whittaker R.H., 1969) se estableció 5 reinos para los seres vivos: Plantae, Animalia, Fungi, Protista y Monera, quedando los procariotas en la división Monera y los Eucariotas en los 4 reinos restantes (Plantae, Animalia, Fungi y Protista). En los años de 1970 se demostró, basándose en estudios con SSU rRNA (small subunit ribosomal Ribonucleic Acid) que los procariotas (reino Monera según Whittaker) se dividían en dos linajes, Eubacteria (dominio Bacteria) y Archaeobacteria (dominio Arquea) (Woese *et al.*, 1990) (figura 1).

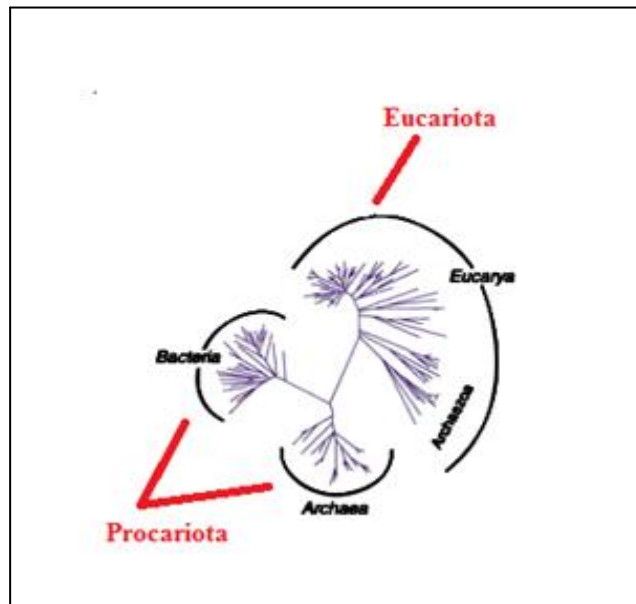


Figura 1. División de los seres vivos.

Los principales dominios (bacteria, arquea y eucariota) se definen a partir de la comparación de las secuencias de RNA ribosómico. Cada dominio se caracteriza por un conjunto de propiedades fenotípicas. Algunas de estas características (Madigan *et al.*, 2004) son:

Pared celular

Todas las bacterias poseen paredes celulares con peptidoglicano. Las únicas excepciones conocidas se encuentran en los miembros del grupo *Plactomyces-Pirella*, cuyas paredes están compuestas de proteína; en los grupos *Micoplasma-Chlamydia*, que carecen de pared celular.

Eucariota y arquea carecen de peptidoglicano. Las paredes celulares de eucariota, están constituidas por celulosa y quitina. En arquea existen varios tipos de paredes celulares, desde las que contienen pseudopeptidoglicano, análogo al peptidoglicano o a las formadas por polisacáridos, proteínas o glicoproteínas.

Lípidos

Bacteria y eucariota sintetizan lípidos de membrana con un esqueleto de ácidos grasos unidos a una molécula de glicerol por un enlace éster. Los lípidos de las arqueas son moléculas con enlaces éter.

En la figura 2 se puede observar la estructura de los enlaces que unen los lípidos al glicerol.

RNA polimerasa

En todos los organismos la transcripción se lleva a cabo por medio de la RNA polimerasa dependientes de DNA (Deoxyribonucleic Acid). El DNA es el molde y el RNA el producto. Las células de bacterias contienen un único tipo de RNA polimerasa con una estructura cuaternaria relativamente simple que contiene cuatro polipéptidos.

La RNA polimerasa de arquea es más compleja que en las bacterias. Ésta en arqueas contiene ocho o más polipéptidos. La principal RNA polimerasa de eucariota (hay tres) contiene 10-12 polipéptidos.

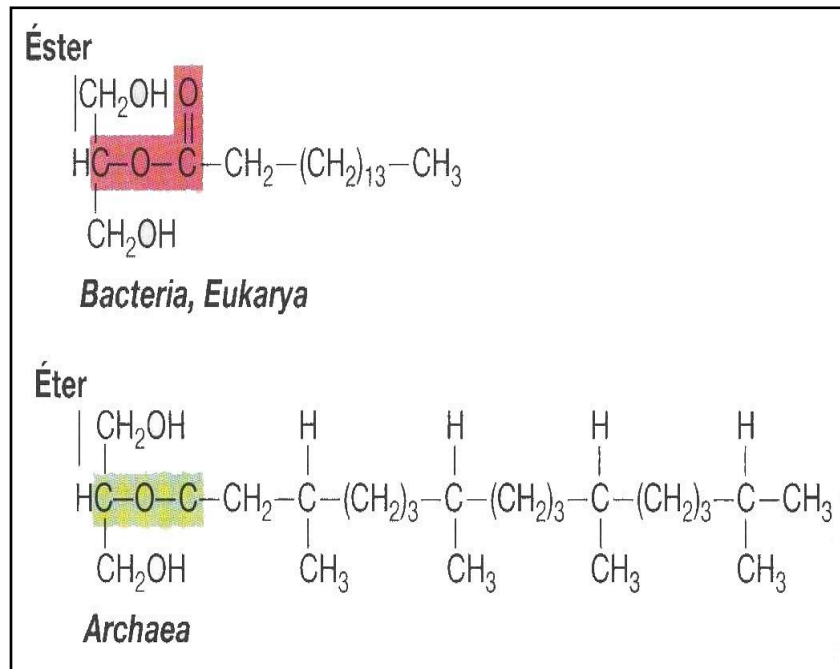


Figura 2. Unión de los lípidos con el glicerol (Madigan *et al.*, 2004).

1.3.1 Clasificación Microbiana

Los sistemas de clasificación están compuestos de taxones (grupo de organismos emparentados) ubicados en sus respectivas categorías taxonómicas. Las categorías taxonómicas fundamentales son: Dominio, Phylum o división, Clase, Orden, Familia, Género y Especie.

Dominio.- Es la categoría taxonómica atribuida a cada uno de los grupos en los que se divide a los seres vivos.

Phylum.- Categoría taxonómica fundamental que agrupa a los organismos de ascendencia común y que responden a un mismo sistema de organización.

Clase.- Grupo taxonómico que comprende varios órdenes de organismos con muchos caracteres comunes.

Orden.- Cada uno de los grupos taxonómicos en que se dividen las clases y que se subdividen en familias.

Familia.- Taxón constituido por varios géneros naturales que poseen gran número de caracteres comunes.

Género.- Taxón que agrupa a especies que comparten ciertos caracteres.

Especie.- Cada uno de los grupos en que se dividen los géneros y que se componen de individuos que, además de los caracteres genéricos, tienen en común otros caracteres por los cuales se asemejan entre sí y se distinguen de los de las demás especies. La especie se subdivide a veces en variedades.

En la figura 3 se puede observar la estructura de la secuencia RNA en la cual se marca la región de cada dominio taxonómico del análisis SSU rRNA.

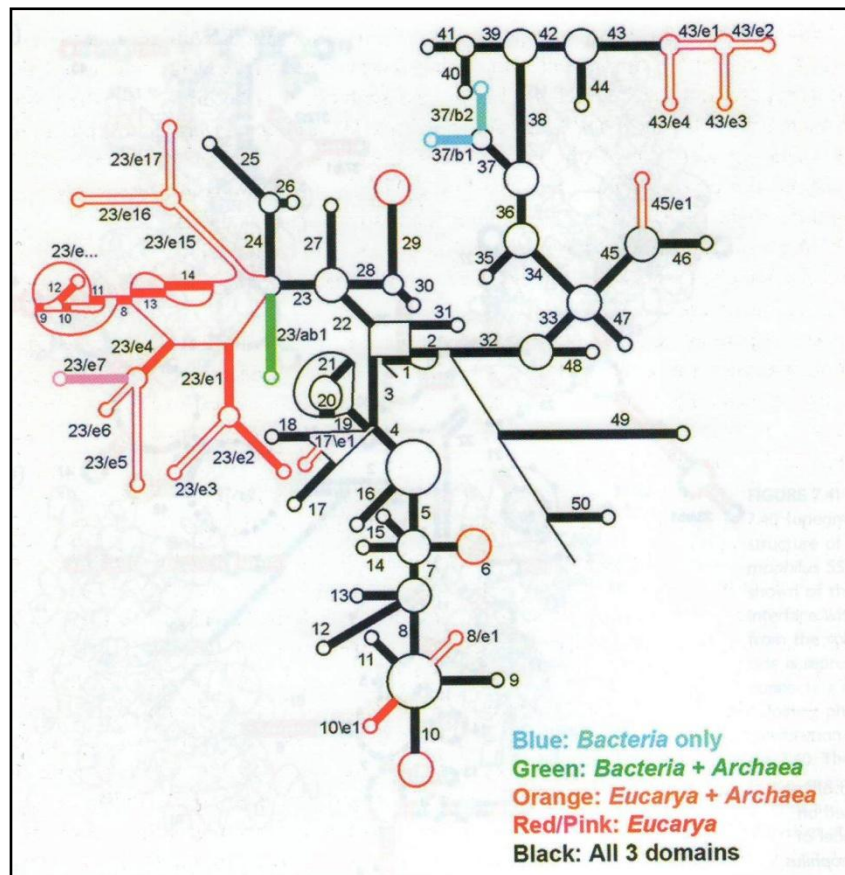


Figura 3. Secuencia RNA ribosómico de *Escherichia coli* (Madigan *et al.*, 2004).

1.4 Dominio Arquea

Son un grupo de microorganismos unicelulares y muy similares en forma y tamaño a las bacterias. Las arquea, como las bacterias, son procariontes que carecen de núcleo celular o cualquier orgánulo dentro de la célula. Difieren de las bacterias, puesto que tienen una evolución independiente a las bacterias y presentan muchas diferencias bioquímicas respecto a las demás formas de vida. Esto hace que a estos

organismos se les clasifique de forma independiente en el árbol filogenético de las 3 ramas evolutivas de la vida (Eucariotas, Arqueas y Bacterias).

Algunos organismos son quimioorganotrofos y por tanto, utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía. La quimiolitotrofia también está bien establecida en las arqueas, siendo el H_2 el principal donador de electrones. La autotrofia está bastante extendida en la arquea. En los organismos metanógenos y presumiblemente en la mayoría de los quimiolitotrofos hipertermófilos, el CO_2 se incorpora por la vía acetyl-CoA (Madigan *et al.*, 1997), es decir, se lleva a cabo una reducción del CO_2 mediante dos vías lineales; una molécula de CO_2 es reducida al grupo metilo del acetato, y la otra es reducida al grupo carbonilo. Sin embargo, para las arqueas metanogénicas esas reacciones son innecesarias ya que obtienen sus grupos metilo directamente de sus donadores de electrones o los fabrican durante la metanogénesis a partir de H_2+CO_2 . De esta forma la célula dispone de grupos metilo en abundancia para empezar el proceso (Madigan *et al.*, 2004). El grupo carbonilo del acetato obtenido durante el crecimiento autotrófico de los metanógenos procede de la CO deshidrogenasa (figura 4).

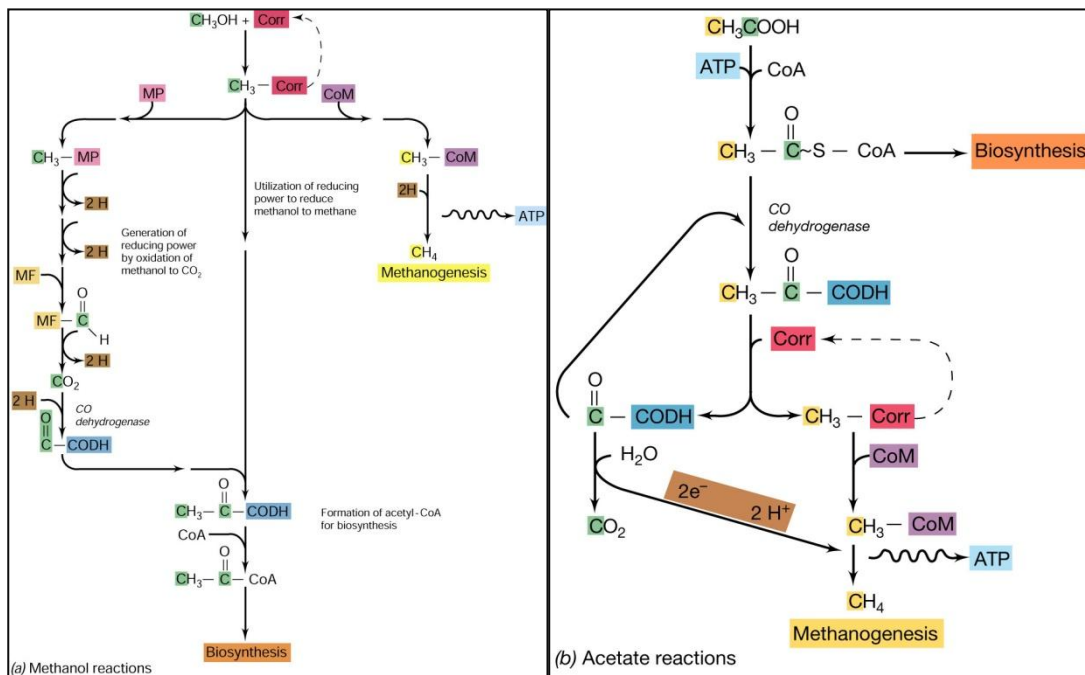


Figura 4. Reacciones por la vía acetyl-CoA de las metanogénicas (Madigan *et al.*, 2004).

Dentro del dominio arquea encontramos 3 phylum (*Euryarchaeota*, *Crenarchaeota* y *Korarchaeota*) (figura 5). En los reactores anaerobios así como en los digestores anaerobios la población de arqueas es abundante. Los órdenes de estos organismos que se han encontrado en estos medios son: *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* y *Methanobacteriales* (Buzzini *et al.*, 2006; Hwang *et al.*, 2008), pertenecientes al phylum *Euryarchaeota*. También se ha reportado estudios de reactores anaerobio-aerobios donde ciertos niveles de oxígeno son tolerables entre la población de arqueas metanogénicas (Kato *et al.*, 1997; Estrada *et al.*, 2001; Anzola *et al.*, 2008).

Las arqueas metanogénicas son parte de la población característica en los digestores de las EDAR (Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales) (Leclerc *et al.*, 2004). Sin embargo también se ha hallado arqueas metanogénicas en el proceso de fangos activos (Gray *et al.*, 2002).

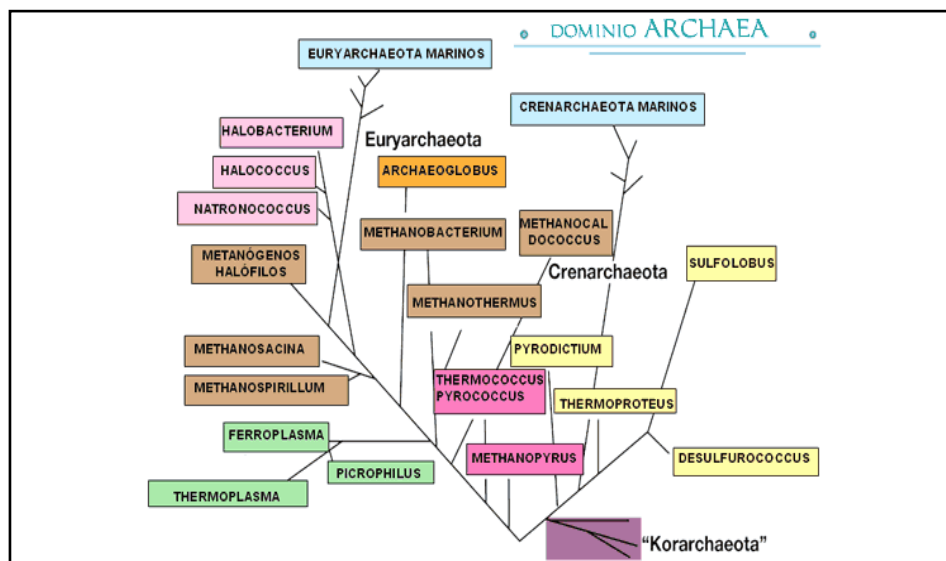


Figura 5. Subdivisiones del dominio Arquea (Madigan *et al.*, 2004).

Los hábitats de los organismos metanógenos pueden ser:

- Sedimentos anóxicos
- Tractos digestivos de animales
- Fuentes hidrotermales de H_2+CO_2
- Sistemas anaerobios de fangos activos (reactores y digestores)
- Endosimbiontes de varios protozoos anaerobios

Su taxonomía se basa tanto en características fenotípicas como filogenéticas. Estructuralmente son procariontes y poseen diversos tipos de paredes celulares según

especie. Fisiológicamente, los metanógenos son anaerobios estrictos y la mayor parte de los metanógenos conocidos son mesófilos aunque también existen extremófilos.

Existen 11 sustratos susceptibles de ser metanizables por cultivos puros de arquea metanogénicas (Madigan *et al.*, 1997), tales como:

- Sustratos “tipo CO₂”. Dióxido de carbono (CO₂), Formato (HCOO⁻) y monóxido de carbono (CO).
- Sustratos “metílicos”. Metanol (CH₃OH), Metilamina (CH₃NH₂), dimetilamina ((CH₃)₂NH), trimetilamina ((CH₃)₃N), metilmercaptano (CH₃SH) y sulfuro de dimetilo ((CH₃)₂S).
- Sustratos “acetotróficos”. Acetato (CH₃COO⁻) y Piruvato (CH₃COCOO⁻).

Un dato importante sobre las arqueas es que se han hallado en fangos activos pero en pequeñas cantidades (Gray *et al.*, 2002; Serviour y Nielsen, 2010), sin embargo no hay muchos estudios sobre estos organismos en el sistema de fangos activos. En 2006 un estudio realizado dio conocimiento de la presencia de Ammonia-Oxidizing Arquea (AOA) perteneciente al phylum *Crenarchaeota*, en bioreactores de varias EDAR en California USA (Park *et al.*, 2006).

1.4.1 Phylum *Crenarchaeota*

Durante más de 100 años se ha creído que las bacterias eran las únicas responsables de la fijación del amonio. Sin embargo se ha hallado una arquea que también es capaz de la oxidación del amonio. La amonia-oxidizing arquea (AOA), *Nitrosopumilus maritimus* fue hallada en el sustrato de un acuario marino tropical (Könneke *et al.*, 2005). Este organismo pertenece a las arqueas *Crenarchaeota*, es un quimilitroautotrofo y crece bajo condiciones mesófilas. El crecimiento de las AOA se inhibe en presencia de carbono orgánico (Erguder *et al.*, 2009). Las AOA fueron detectadas en fangos activos de 5 EDAR en USA. Estas EDAR operaban a bajas concentraciones de oxígeno y altos tiempos de retención hidráulico (Park *et al.*, 2006). En sistemas de MBR (Membrane Bioreactor con filtros sumergidos y columnas aireada-anóxica) se ha hallado también presencia de las AOA (Gómez-Silvan *et al.*, 2010).

Un estudio de las cinéticas de oxidación del amonio (Martens *et al.*, 2009) demostró que las AOA crecen en ambientes oligotróficos con altas y bajas concentraciones de amonio y fósforo, teniendo una ventaja ante las AOB. Estudios previos han demostrado que en ambientes oligotróficos las AOA son significativamente más numerosas que AOB (Martens-Habbena *et al.*, 2009).

También se ha estudiado los factores que afectan a la presencia de las AOA (Erguder *et al.*, 2009), sin embargo, es limitado lo que se sabe de los factores ambientales que influyen en estos organismos. La mayoría de las AOA estudiadas reflejan influencia de factores hidrológicos y biogeoquímicos (Erguder *et al.*, 2009). Se considera que las AOA pueden tener un amplio rango de condiciones de crecimiento (Erguder *et al.*, 2009). En la Figura 6 se muestra la propuesta de la influencia dominio/actividad de las AOA en respuesta a la variación del fosfato, del pH, del amonio y del oxígeno disuelto bajo presencia de sulfitos.

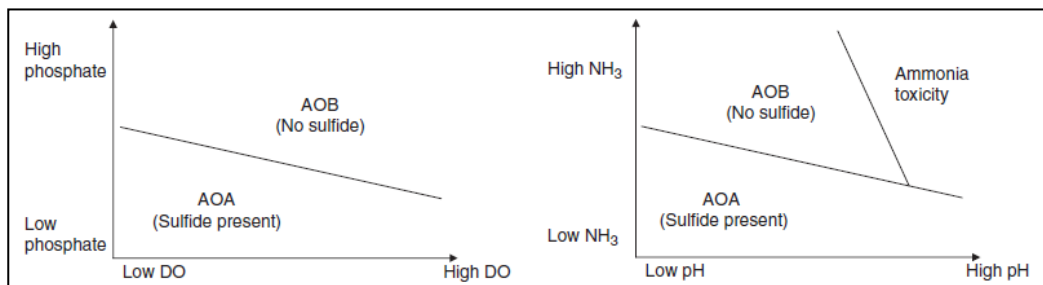


Figura 6. Posible relación dominio/actividad de la comunidad AOA (Erguder *et al.*, 2009).

Según Könneke (Könneke *et al.*, 2005) la taxonomía propuesta para la AOA es la siguiente:

Dominio: *Arquea*

Phylum *Crenarchaeota phy. nov.*

Orden *Nitrosopumilales*

Familia *Nitrosopumilaceae*

Género *Nitrosopumilus maritimus*

1.4.2 Phylum *Euryarchaeota*

Tal como se había mencionado dentro de este phylum encontramos a las arqueas metanogénicas.

Estos organismos han sido hallados en poca proporción en procesos aerobios en el tratamiento de aguas residuales (Gray *et al.*, 2002).

En la figura 7 que se muestra a continuación, se puede apreciar un grupo de las arqueas *methanosarciales* que pertenecen a este phylum. Las arqueas de esta figura corresponden a organismos hallados en la EDAR de la Cuenca del Carraixet.

Los organismos que se puede observar en la figura 7 se encuentran en diferentes ambientes. En la figura 7A, las arqueas *methanosarciales* están en un ambiente anaerobio (digestor anaerobio). Sin embargo en la figura 7B, se observa también arqueas *methanosarciales* en un ambiente aerobio (reactor aerobio).

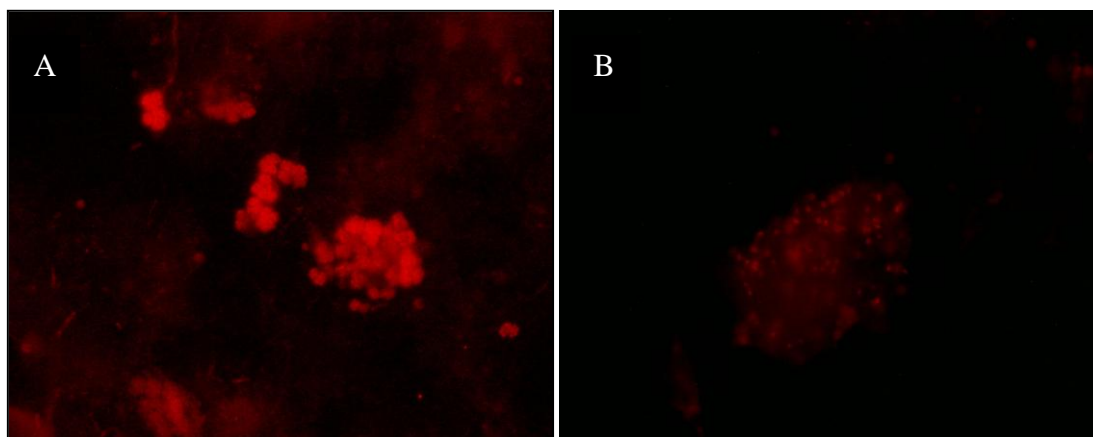


Figura 7. Arqueas metanogénicas. A) Arqueas *methanosarciales* en una muestra de digestor anaerobio en la EDAR Carraixet. B) Arqueas *methanosarciales* en una muestra del reactor aerobio en la EDAR Carraixet. 600X.

Las arqueas *methanosarciales* en un digestor anaerobio (figura 7A) forman agregados muy marcados y con forma de racimos, mientras que las *methanosarciales* encontradas en un reactor aerobio (figura 7B) están dentro del floculo, con menor abundancia y dispersas en él.

1.4.2.1 Organismos metanógenos

La característica común de los organismos metanogénicos y de otros organismos litótrofos, es el uso de hidrógeno como fuente de energía y del dióxido de carbono como aceptor de electrones. Este modo de generación de energía se ajusta a los definidos como quimiolitótrofos.

Los organismos metanogénicos juegan un papel muy importante en el circuito degradativo del ciclo del carbono. Éstos utilizan como sustrato para generar metano, el producto de degradación de las bacterias formadoras de ácidos (Catalán, 1997).

El proceso que comprende la formación del metano a partir de acético y de hidrógeno se llama metanogénesis. Ésta es la única vía por la cual los organismos metanogénicos pueden obtener energía para su crecimiento. Las arqueas

metanogénicas son los únicos productores de metano como un producto catabólico final. Estos organismos pueden utilizar acetato, H₂, CO₂ y/u otras fuentes de carbono como sustrato (Salazar, 2008).

La clasificación taxonómica de los metanógenos se ha realizado mediante varios métodos entre los que se incluye el estudio de su morfología, motilidad, imágenes por microscopía electrónica, morfología de la colonia, características nutricionales, tasa y condiciones de crecimiento, productos metabólicos finales, tinción Gram, susceptibilidad a lisis, análisis de lípidos, distribución de poliaminas, hibridación de ácidos nucleídos y secuenciación del 16S rRNA entre otros estudios (Boone *et al.*, 1988). En 1977 (Woese *et al.*, 1977) clasificó a los metanogénicos dentro del dominio arquea. Originalmente sólo se clasificaron los metanógenos en este nuevo dominio; las arqueas eran consideradas extremófilos que sólo vivían en hábitats como aguas termales y lagos salados. Se han definido 5 órdenes, 10 familias, 26 géneros y 74 especies validas (Boone *et al.*, 1993; Salazar, 2008) de organismos metanogénicos.

- Orden *Methanobacteriales*

Incluye a dos familias; la familia *Methanobacteriaceae* y la familia *Metanothermaceae*. La familia *Methanobacteriaceae* tiene cuatro géneros morfológicamente distintos. Éstos incluyen especies recuperadas de una variedad de hábitats (agua dulces, rumen bovino, madera, intestino de termitas, etc.), las cuales son capaces de utilizar sustratos como H₂/CO₂, 2-propanol, formato y metanol para producir CH₄. La familia *Metanothermaceae* consiste de un único género termófilo extremo hidrogenotrofo.

- Orden *Methanococcales*

Incluye a dos familias, *Methanococcaceae* y *Methanocaldococcaceae*, cada familia con dos géneros. Los cuatro géneros son hidrógenotrofos principalmente de ambientes marinos y costeros. La mayoría de las especies son capaces de utilizar H₂ y formato como donadores de electrones.

- Orden *Methanomicrobiales*

Comprende a tres familias y nueve géneros de metanogénicas hidrogenotrofas. La familia *Methanomicrobiaceae* incluye a especies aisladas de varios ambientes. La familia *Methanocorpusculaceae* incluye a tres géneros que utilizan H₂/CO₂ y formato como sustrato. La familia *Methanospirillaceae* es una familia nueva con un único género; sus miembros se han reportado en varios hábitats y son capaces de utilizar diferentes donadores de electrones para la metanogénesis del CO₂.

- Orden *Methanosarcinales*

En 1993 se (Boone *et al.*, 1993) propuso reagrupar a todos las metanogénicas acetotróficas y/o metilotróficas dentro de dos familias en este orden. La familia

Methanosarcinaceae que incluye a seis géneros de metanogénicas muy versátiles aisladas de varios hábitats y que son capaces de utilizar H₂/CO₂, acetato o compuestos metilo como sustratos. La familia *Methanosaetaceae* incluye a un único género de metanógena acetotrófica obligada.

- Orden *Methanopyrales*

Es un nuevo orden de metanogénicas hipertermofílicas, las cuales no están relacionadas con todas las otras metanogénicas conocidas. El orden incluye una única familia, *Methanopyraceae* y una especie *Methanopyrus kandleri*.

Se ha determinado la secuencia del DNA del genoma total *Methanococcus jannaschii* (Bult *et al.*, 1996) y *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Smith *et al.*, 1997). Recientemente, la secuencia del DNA para *archaeoglobul fulgidus* también ha sido publicado (Klenk *et al.*, 1997). Ésta arquea sulfato-reductora filogenéticamente está estrechamente relacionada con el género *Methanosarcinales*, con quien comparte muchas características bioquímicas en común.

Basándonos en el manual Bergey's (Garrity *et al.*, 2001), tenemos la siguiente taxonomía de las arqueas metanogénicas:

Phylum	<i>Euryarchaeota</i>
Clase	<i>Methanobacteria</i>
Orden	<i>Methanobacteriales</i>
Familia	<i>Methanobacteriaceae</i>
Género	<i>Methanobacterium</i>
Género	<i>Methanobrevibacter</i>
Género	<i>Methanosphaera</i>
Género	<i>Methanothermobacter</i>
Familia	<i>Methanothermaceae</i>
Género	<i>Methanothermus</i>
Clase	<i>Methanococci</i>
Orden	<i>Methanococcales</i>
Familia	<i>Methanococcaceae</i>
Género	<i>Methanococcus</i>
Género	<i>Methanothermococcus</i>
Familia	<i>Methanocaldococcaceae</i>
Género	<i>Methanocaldococcus</i>
Género	<i>Methanotorris</i>
Clase	<i>Methanomicrobia</i>
Orden	<i>Methanomicrobiales</i>

	Familia	<i>Methanomicrobiaceae</i>
	Género	<i>Methanomicrobium</i>
	Género	<i>Methanoculleus</i>
	Género	<i>Methanofollis</i>
	Género	<i>Methanogenium</i>
	Género	<i>Methanolacinia</i>
	Género	<i>Methanoplanus</i>
	Familia	<i>Methanocorpusculaceae</i>
	Género	<i>Methanocorpusculum</i>
	Familia	<i>Methanospirillaceae</i>
	Género	<i>Methanospirillum</i>
Orden		<i>Methanosarciales</i>
	Familia	<i>Methanosarcinaceae</i>
	Género	<i>Methanosarcina</i>
	Género	<i>Methanococcoides</i>
	Género	<i>Methanohalobium</i>
	Género	<i>Methanohalophilus</i>
	Género	<i>Methanolobus</i>
	Género	<i>Methanomicrococcus</i>
	Género	<i>Methanosalsum</i>
	Familia	<i>Methanosaetaceae</i>
	Género	<i>Methanosaeta</i>
Clase		<i>Methanopyri</i>
Orden		<i>Methanopyrales</i>
	Familia	<i>Methanopyraceae</i>
	Género	<i>Methanopyrus</i>

Las arqueas metanogénicas fueron el primer grupo microbiano en tener su taxonomía basada en la filogenia deducida por la secuencia de 16S rRNA (Balch *et al.*, 1979; Raskin *et al.*, 1994). La distribución limitada filogenética de las metanogénicas sugirió que una base de datos de secuencia de rRNA podría ser la base para el diseño de sondas que abarquen la mayoría de los miembros del grupo. Para esto se desarrolló y caracterizó una colección de sondas metanogénicas (figura 8).

Entre las arqueas metanogénicas podemos distinguir 3 principales grupos nutricionales:

1. Arqueas metanogénicas hidrogenotrofas: Estas arqueas utilizan como sustrato el hidrógeno más dióxido de carbono y algunas el formato.
2. Arqueas metanogénicas acetoclásticas: Estas arqueas utilizan el acetato como sustrato y según las especies hidrógeno más dióxido de carbono y metilaminas.

3. Arqueas metanogénicas metilotrofas: éstas utilizan como sustrato metanol, metilaminas y metildisulfuros.

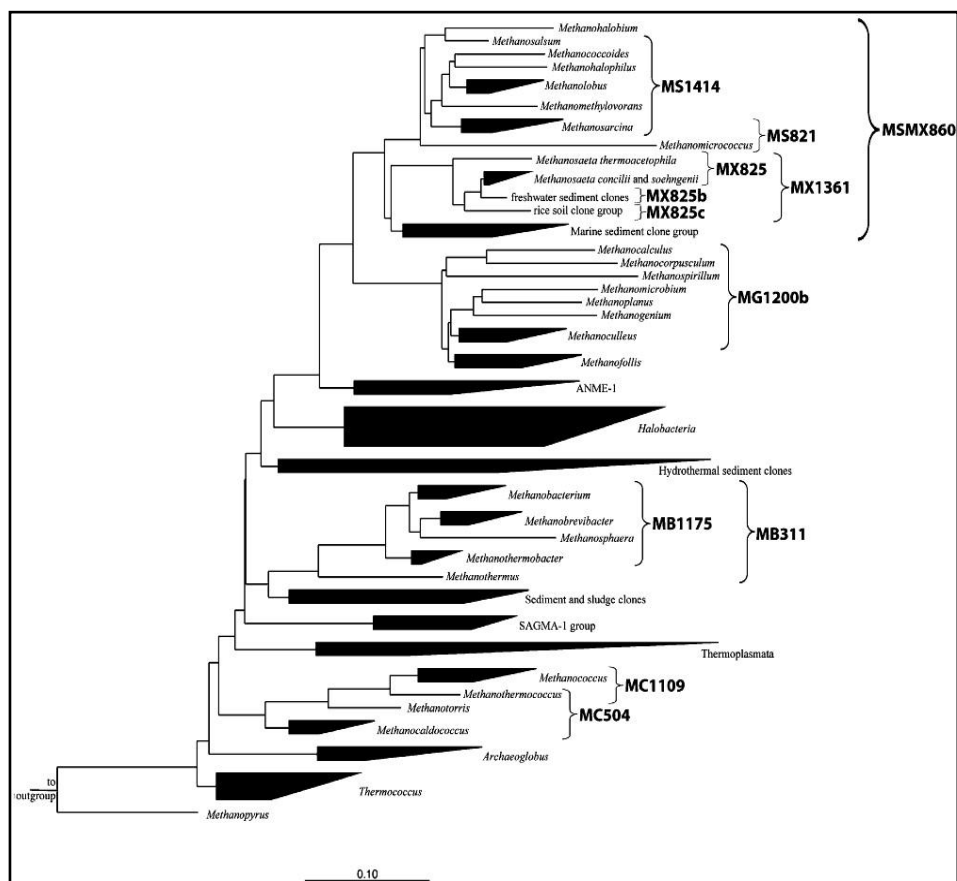


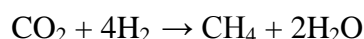
Figura 8. Clasificación de las sondas metanogénicas en relación con las bacterias metanogénicas que hibridan (Crocetti *et al.*, 2006).

En las especies descritas hay 67% de hidrogenotrofas, 13% de acetoclásticas, 27% de metilotrofas obligadas y el 3% son hidrógeno-metilotrofas y usan el hidrógeno para reducir el metanol a metano. Algunas especies son alcoholotrofas y producen metano en presencia de ciertos alcoholes como donadores de hidrógeno. El monóxido de carbono puede también ser convertido en metano, pero no constituye un sustrato importante en la metanogénesis. Sin embargo, existen al menos 11 sustratos susceptibles de ser metanizables por cultivos puros de metano-arqueas (figura 9).

Sustratos metanolizables por varias <i>Archaea</i> metanogénicas	
I. Sustratos de tipo CO₂	
	Dióxido de carbono, CO ₂ (con electrones derivados del H ₂ , ciertos alcoholes o el piruvato, Formato, HCOO ⁻ Monóxido de carbono, CO
II. Sustratos metílicos	
	Metanol, CH ₃ OH Metilamina, CH ₃ NH ₃ ⁺ Dimetilamina, (CH ₃) ₂ NH ₂ ⁺ Trimetilamina, (CH ₃) ₃ NH ⁺ Metilmercaptano, CH ₃ SH Sulfuro de dimetilo, (CH ₃) ₂ S
III. Sustratos acetotróficos	
	Acetato, CH ₃ COO ⁻ Piruvato, CH ₃ COCOO ⁻

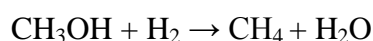
Figura 9. Sustratos de las metanogénicas (Madigan *et al.*, 2004).

En la figura 9 podemos apreciar que se dividen en 3 clases de sustratos; la primera clase incluye un sustrato muy importante como es el CO₂, que es reducido hasta metano utilizando el hidrógeno como fuente de poder reductor:



Otros sustratos incluyen el formato y monóxido de carbono.

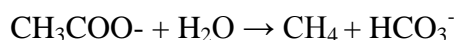
La segunda clase de sustratos metanogénicas son sustancias con grupo metilo. Utilizando el metanol como modelo metílico, la formación del metano puede ocurrir de dos formas. La primera incluye la reducción del metanol por una fuente externa de electrones como es el hidrógeno:



Alternativamente y en ausencia de hidrógeno, algunas moléculas de metanol puede oxidarse hasta dióxido de carbono para generar los electrones necesarios para reducir otras moléculas de metanol hasta metano:



La última clase de sustrato es a partir de la ruptura del acetato hasta dióxido de carbono y metano:



Solo algunos metanógenos son acetotróficos (tabla 1), pero aproximadamente dos tercios del metano generado en la metanogénesis a partir de fango activo deriva del acetato, y solamente un tercio lo hace a partir del anhídrido carbónico (CO₂) e hidrógeno; es decir, este tipo de acetotrofia tiene gran significado en la naturaleza.

En la tabla 1 se aprecia que organismos metanotrofos corresponde a cada grupo nutricional conocido de las arqueas metanogénicas, así como la reacción que se lleva a cabo a partir del sustrato correspondiente al grupo nutricional.

Tabla 1. Grupos nutricionales de las arqueas metanogénicas (García J. L, 1991)

1. Hidrogenotróficas		
H₂ + CO₂ + formato según especies → CH₄		
<i>Methanobacterium</i>	<i>Methanothermus</i>	<i>Methanofollis</i>
<i>Methanococcus</i>	<i>Methanolacinia</i>	<i>Methanothermobacter</i>
<i>Methanogenium</i>	<i>Methanospirillum</i>	<i>Methanothermococcus</i>
<i>Methanopyrus</i>	<i>Methanobrevibacter</i>	<i>Methanocaldococcus</i>
<i>Methanoculleus</i>	<i>Methanomicrobium</i>	<i>Methanotorris</i>
<i>Methanoplanus</i>	<i>Methanocorpusculum</i>	
2. Acetoclásticas		
Acetato + según especies H₂ + CO₂ + Formato, Metanol y Metilaminas → CH₄		
<i>Methanosarcina</i>		
<i>Methanosaeta</i>		
3. Metilotróficas		
Metanol + Metilaminas → CH₄		
<i>Methanolobus</i>	<i>Methanohalophilus</i>	<i>Methanocorpusculum</i>
<i>Methanohalobium</i>	<i>Methanococcoides</i>	<i>Methanobacterium</i>
<i>Methanogenium</i>	<i>Methanospirillum</i>	<i>Methanomicrococcus</i>
4. Hidrogeno-metilotróficas		
H₂ + Metanol → CH₄		
<i>Methanosphaera</i>		
5. Alcoholotróficas		
CO₂ + alcohol (2-propanol, 2-butanol, etanol) → CH₄		
<i>Methanobacterium</i>	<i>Methanogenium</i>	<i>Methanofollis</i>
<i>Methanospirillum</i>	<i>Methanocorpusculum</i>	

1.5 Dominio Bacteria

Las bacterias son microorganismos unicelulares que se multiplican por escisión celular. Éstas son las principales responsables de la mineralización de la materia orgánica.

Desde el punto de vista metabólico, las bacterias se clasifican en autótrofas, es decir, que tienen como fuente de carbono dióxido de carbono y en bacterias cuya fuente de carbono son compuestos orgánicos ya sintetizados por otros organismos. A éstas se les denomina heterótrofas. También se clasifican por su vía energética, es decir, las bacterias cuya fuente de energía es la luz, se les llama fotótrofas y a las bacterias que obtienen su energía de sustancias químicas, se les denomina bacterias quimiótrofas. Por otra parte, en función de su poder reductor, los organismos pueden ser litótrofos (oxidan compuestos inorgánicos) y organótrofos (oxidan compuestos orgánicos) (Servioir y Nielsen, 2010).

La principal ventaja competitiva de las bacterias, reside en su extraordinaria facultad metabólica, es decir, su capacidad de adaptación a condiciones ambientales y sustratos orgánicos muy variados. Ciertos alimentos o sustratos orgánicos estimulan selectivamente la acción metabólica de algunas bacterias. De la misma forma, las sustancias resultantes del metabolismo de un grupo de bacterias, estimulan a otros grupos de bacterias a multiplicarse (Catalán, 1997).

El conocimiento de las comunidades bacterianas es de particular interés. Algunos datos de estudios sugieren que las bacterias quimioheterótrofas son las bacterias mayoritarias en los lodos o fangos activos, ya que incluyen una gran variedad de bacterias (Servioir y Nielsen, 2010). Las técnicas microbiológicas convencionales sugieren como grupo dominante a las γ -*Proteobacteria* en las EDAR, mientras que la técnica FISH (Fluorescent *in situ* Hibridization) detecta como grupo dominante a las β -*Proteobacteria*. Entre este grupo las bacterias más abundantes son de la familia *Comomonadaceae* (Khan *et al.*, 2002; Spring *et al.*, 2004) y género *Acidovorax* (Schule *et al.*, 1999). El segundo grupo dominante que se detecta por FISH son las α -*Proteobacteria* del género *Sphingomonas* (Neef *et al.*, 1999) y el género *Caulobacter* (Holm *et al.*, 1996). También se ha hallado miembros de *Actinobacteria* o de δ -*Proteobacteria* como las SRB (Sulfate Reducing Bacteria) (Servioir y Nielsen, 2010). Todos los organismos antes mencionados son ejemplos de quimioheterótrofos encontrados en los fangos activos.

En los fangos activos encontramos bacterias formadoras de flóculos y bacterias no formadoras de flóculos, de las cuales las formadoras de flóculos son de gran interés en los sistemas de tratamiento de las EDAR. El flóculo es una estructura heterogénea compleja formada por agregados de bacterias. La formación y estructura del flóculos

es un factor importante en la sedimentabilidad del fango. Más de 300 cepas bacterianas crecen dentro de los flóculos de los fangos activos. En el flóculo se realiza la oxidación de la materia orgánica así como la transformación de los nutrientes. También se lleva a cabo la producción de polisacáridos y otros polímeros que sirven para la formación de flóculos de biomasa (Bitton G., 1994).

En la figura 10 se muestra un diagrama con las principales reacciones llevadas a cabo por las bacterias dentro de los fangos activos. Las reacciones que se detallan en dicha figura son las de interés para los tratamientos de aguas residuales por la eliminación tanto de la materia orgánica como por la eliminación de nutrientes.

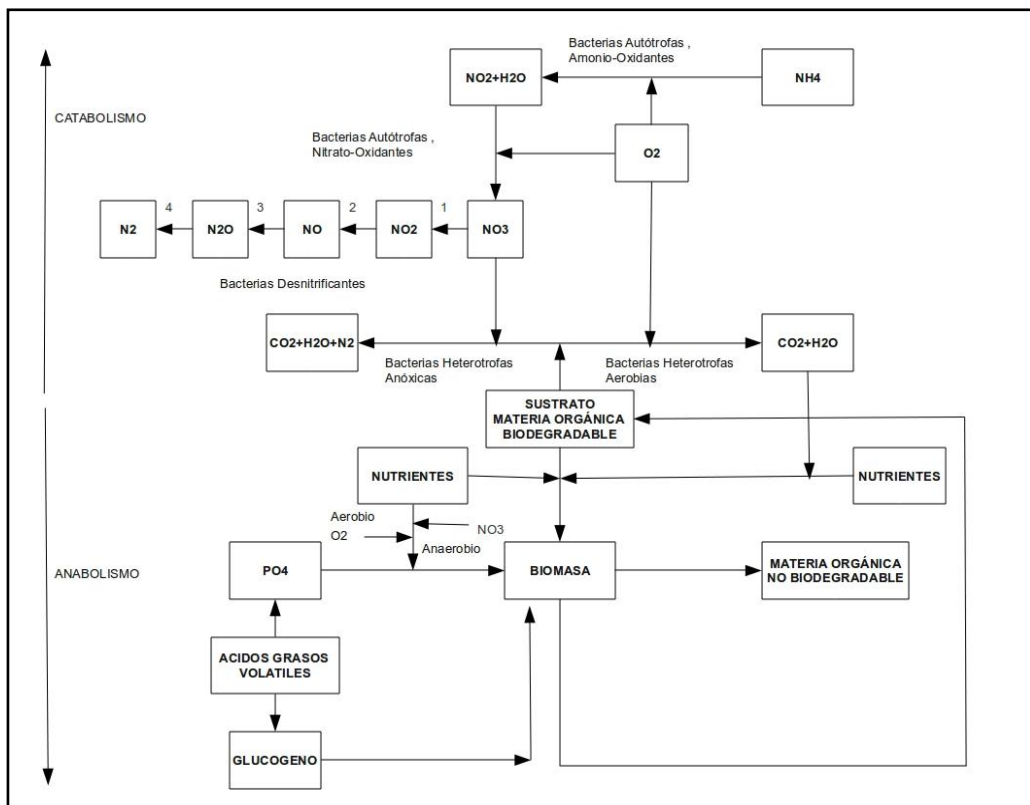


Figura 10. Reacciones llevadas a cabo en los fangos activos.

Algunas de las reacciones que se llevan a cabo en el tratamiento biológico y que aparecen en la figura 10 son:

La reacción de NH_4^+ a NO_2^- la llevan a cabo bacterias amonio-oxidantes tales como *Nitrosomonas* (*N. europea*, *N. oligocarbogenes*). Otras bacterias que realizan esta reacción son *Nitrospira*, *Nitrosococcus* y *Nitrosolobus*.

La reacción de NO_2^- a NO_3^- la lleva a cabo bacterias nitrato-oxidantes como *Nitrobacter* (*N. agilis*, *N. Winogradski*), *Nitrospira* y *Nitrococcus*.

La oxidación del Amonio (NH_4^+) a Nitrato (NO_3^-) son las realizadas por las bacterias autótrofas en los sistemas aireados.

En la reacción de NO_3^- a N_2 intervienen diversos organismos organotrofos, litotrofos y fototrofos. Los organismos que llevan a cabo esta reacción se les denominan desnitrificantes. Entre los representantes de este grupo de bacterias encontramos a géneros como *Zoogloea*, *Azoarcus* y *Thaurea* entre otros.

Las bacterias desnitrificantes realizan por vías enzimáticas el paso de NO_3^- a N_2 . En la figura 10 se indica para cada reacción la enzima que participa. A continuación se detallan las enzimas que son responsables de la desnitrificación:

1. nitrato reductasa
2. nitrito reductasa
3. oxido-nítrico reductasa
4. oxido-nitroso reductasa

Dentro del dominio Bacteria se han descubierto al menos 40 divisiones (Phylum). Un estudio demostró que los phylum que podemos encontrar en las aguas residuales son: *Proteobacteria*, *Bacteroides*, *Planctomycetes*, *Nitrospira*, *Fusobacteria*, *Firmicutes*, *Cloroflexi*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia* y *Spirochaetes* (Sanapareddy *et al.*, 2009), siendo las dominantes el grupo de las *Proteobacteria*. A su vez, este grupo está dividido en los siguientes subgrupos: α -*Proteobacteria*, β -*Proteobacteria*, γ -*Proteobacteria*, δ -*Proteobacteria* y ε -*Proteobacteria* (figura 11).

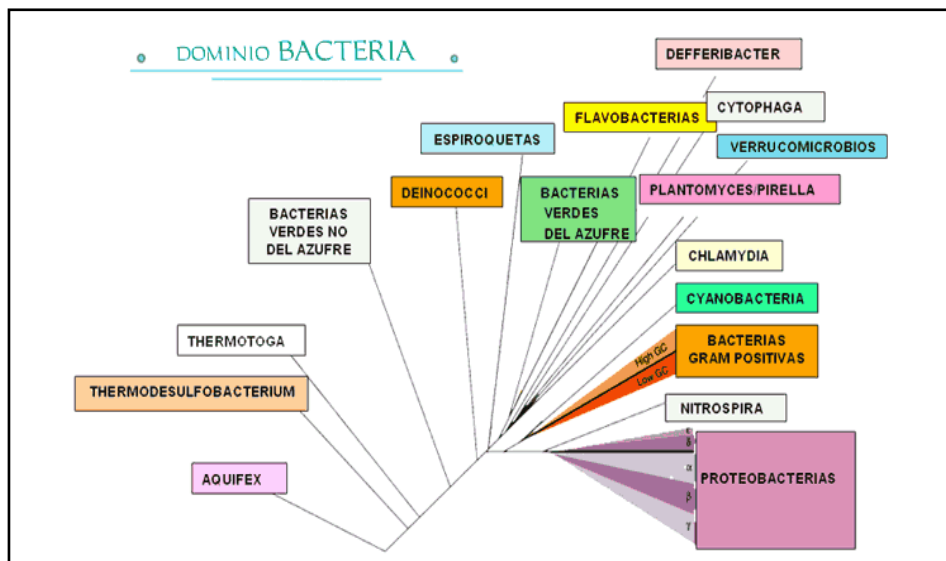


Figura 11. Subdivisión del dominio Bacteria (Madigan *et al.*, 2004).

Las bacterias representan la mayor parte de la comunidad microbiana que se encuentra en los procesos de fangos activos. Este dominio está integrado por muchos phylum. Para este estudio y en base a trabajos ya realizados en el estudio de las comunidades microbianas, tanto de bacterias como de arqueas, se definió los posibles phylum bacterianos que se pueden encontrar.

En la figura 12 se muestran los organismos detectados en una muestra de fangos activos con proceso de nitrificación (Maixner *et al.*, 2008). En esta figura se puede observar la gran diversidad que se puede encontrar en las muestras de aguas residuales. Los phylum están representados con distintos colores.

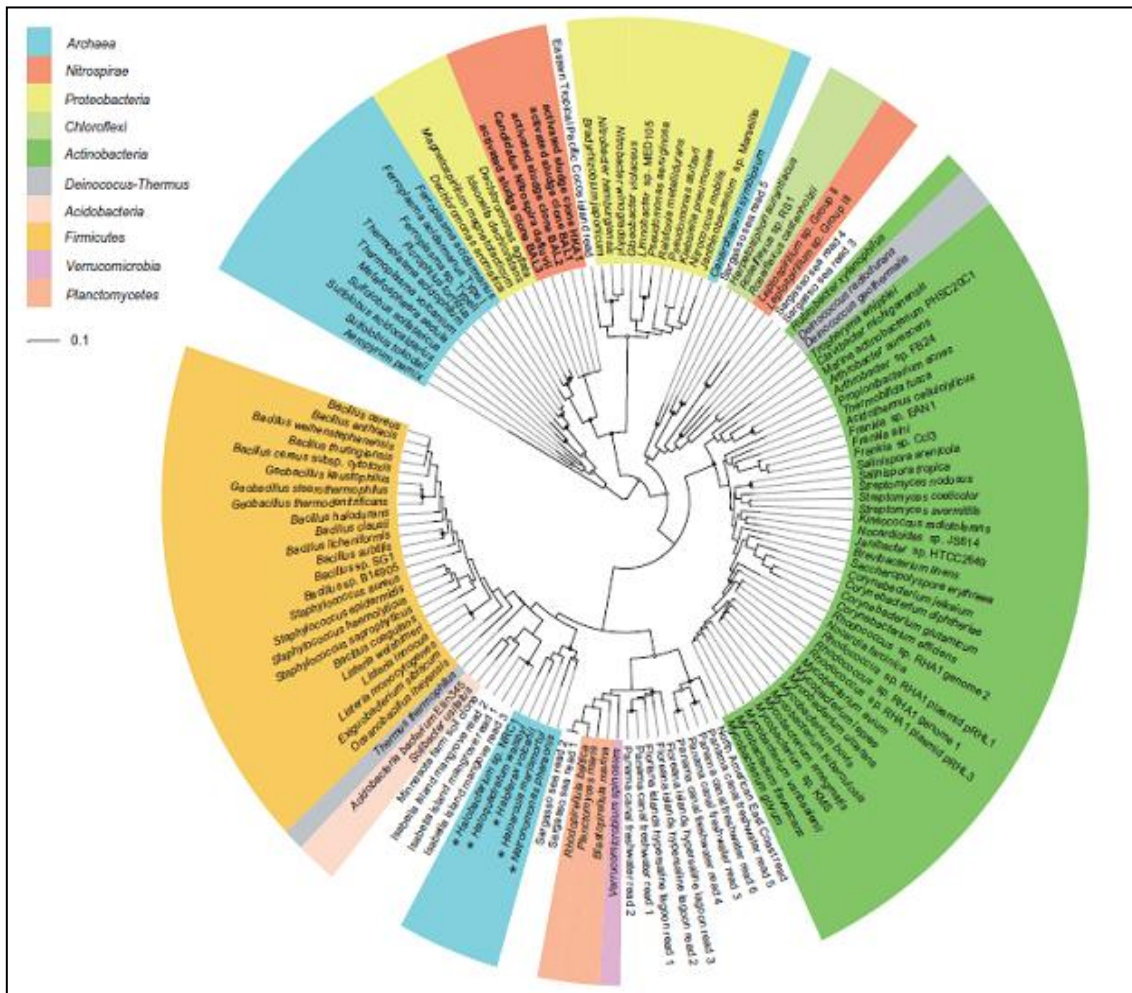


Figura 12. Secuencias halladas en muestras de fangos activos con proceso de nitrificación (Maixner *et al.*, 2008).

1.5.1 Phylum bacterianos

Los phylum que se describen en el presente trabajo son: *Chloroflexi*, *Nitrospira*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria* y *Bacteroides*. Todos estos phylum han sido descritos en varios estudios como parte de la composición de la comunidad de bacterias que se hallan en el tratamiento de las aguas residuales mediante fangos activos.

1.5.1.1 Phylum *Chloroflexi*

El phylum *Chloroflexi* también es llamado “bacterias verdes no del azufre”. Este phylum está compuesto de pocos géneros, el más conocido y estudiado es *Chloroflexus*.

Chloroflexus es un organismo anoxifototrofo que utiliza compuestos orgánicos como fuentes de carbono (heterotrofia). Sin embargo también pueden utilizar como fuente de carbono compuestos como H_2S+CO_2 o H_2+CO_2 (autotrofia). Bajo condiciones aerobias y en la oscuridad este organismo puede presentar quimioorganotrofia (Madigan *et al.*, 2004).

La mayoría de las *Chloroflexi* son filamentosas y están presentes en los fangos activos (Madigan *et al.*, 2004). Sin embargo presentan baja abundancia (Kragelund *et al.*, 2007). Ocasionalmente se las relaciona con el bulking en las EDAR (Beer *et al.*, 2002; Björnsson *et al.*, 2002).

En un estudio realizado por pirosecuenciación para el análisis de la diversidad de las bacterias en el tratamiento de aguas (Sanapareddy *et al.*, 2009) se identificó una baja abundancia del phylum *Chloroflexi*.

Basándonos en la jerarquía taxonómica según el manual de Bergey (Garrity *et al.*, 2004), se muestran a continuación los organismos del phylum *Chloroflexi* encontrados en las aguas residuales (Beer *et al.*, 2002; Björnsson *et al.*, 2002; Kragelund *et al.*, 2007; Miura *et al.*, 2007):

Phylum	<i>Chloroflexi phy. nov.</i>
Clase	<i>Chloroflexi</i>
Orden	<i>Chloroflexales</i>
Familia	<i>Chloroflexaceae</i>
Género	<i>Chloroflexus</i>
Especie	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>

	Especie	<i>Chloroflexus aggregans</i>
	Género	<i>Roseiflexus</i>
	Especie	<i>Roseiflexus castenholzii</i>
Orden		<i>Herpetosiphonales</i>
	Familia	<i>Herpetosiphonaceae</i>
	Género	<i>Herpetosiphon</i>
	Especie	<i>Herpetosiphon aurantiacus</i>
	Especie	<i>Herpetosiphon geysericola</i>
Clase		<i>Anaerolineae</i>
Orden		<i>Anaerolinaeles</i>
	Familia	<i>Anaerolinaceae</i>
	Género	<i>Anaerolinea</i>
	Especie	<i>Anaerolinea Thermophila</i>
	Género	<i>Caldilinea</i>
	Especie	<i>Caldilinea aerophila</i>

En la figura 13 se muestra una hibridación FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization) de una muestra de fango activado donde se aprecia un flóculo de bacterias junto con bacterias filamentosas (*Chloroflexi*).

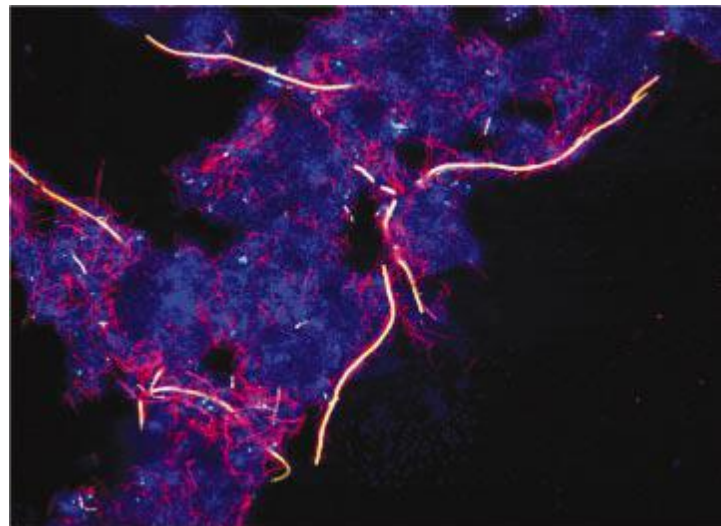


Figura 13. *Chloroflexi* encontradas con FISH en un reactor a escala de laboratorio con las sondas CFX1223 y GNSB941. Las células en azul se han hibridado con EUBMIX, las bacterias *Chloroflexi* se aprecian en color blanco y rosa. (Björnsson *et al.*, 2002).

1.5.1.2 Phylum *Nitrospira*

Son organismos quimiolitotrofos y mesófilos (Madigan *et al.*, 2004). Los primeros organismos descritos de este phylum fueron hallados en aguas de mar (muestras del océano Atlántico), *Nitrospira marina* (Watson *et al.*, 1986; Daims *et al.*, 2001). Más tarde se halló *Nitrospira moscoviensis* en un sistema de calefacción en Moscú (Ehrich *et al.*, 1995). Estudios de laboratorio basados en microscopía y técnicas moleculares revelan que las bacterias *Nitrospira* se hallan en diferentes hábitats (Wagner *et al.*, 2002). La aplicación y combinación de FISH con microautoradiografía (MAR-FISH), o con microelectrodos reveló nuevos aspectos de su metabolismo, tales como la degradación del ClO_2^- a Cl^- y O_2 (Maixner, 2009).

Los primeros análisis de FISH enfocados a la cuantificación de las poblaciones de las bacterias nitrificantes, revelaron que las bacterias del género *Nitrospira* eran el grupo NOB (Nitrifying Oxidizing Bacteria) dominante en reactores nitrificantes a escala de laboratorio y en las EDAR a bajas concentraciones de O_2 y no *Nitrobacter* como se pensaba (Wagner *et al.*, 1996; Hovanec *et al.*, 1998, Juretschko *et al.*, 1998, Schramm *et al.*, 1998; Okabe *et al.*, 1999). Además, la técnica FISH demostró que las bacterias *Nitrospira* forman flóculos y biofilms microbianos dentro de los fangos activos (Daims *et al.*, 2001).

Nitrospira crece autotróficamente y realiza la oxidación del NO_2^- a NO_3^- . Tiene una relación genética estrecha con las demás bacterias nitrificantes, sin embargo fisiológicamente es muy diferente y carece de sistemas de membranas internas, como es el caso de las bacterias nitrificantes (Madigan *et al.*, 2004). En plantas de tratamiento de aguas residuales y en reactores de nitrificación se ha hallado el organismo *Candidatus Nitrospira defluvii* (Spieck *et al.*, 2006).

Otros géneros dentro del grupo de *Nitrospira* son *Leptospirillum*, un quimiolitotrofo oxidante de hierro y el género *Thermodesulfobivrio*, una bacteria reductora de sulfato y termofílica que habita en manantiales de agua caliente (Garrity *et al.*, 2004).

Se desglosa la taxonomía de los organismos que encontramos en las aguas residuales del phylum *Nitrospira* (Daims *et al.*, 2001) según el manual de Bergey (Garrity *et al.*, 2004):

Phylum *Nitrospira*
Clase *Nitrospira*
Orden *Nitrospirales*
Familia *Nitrospiraceae*

Género	<i>Nitrospira</i>
Especie	<i>Nitrospira marina</i>
Especie	<i>Nitrospira moscoviensis</i>
Género	<i>Leptospirillum</i>
Especie	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>
Género	<i>Magnetobacterium</i>
Especie	<i>Candidatus Magnetobacterium bavaricum</i>
Género	<i>Thermodesulfovibrio</i>
Especie	<i>Thermodesulfovibrio yellowstonii</i>
Especie	<i>Thermodesulfovibrio islamdius</i>

En la figura 14 se aprecia organismos pertenecientes al phylum *Nitrospira* en muestras de fangos activos.

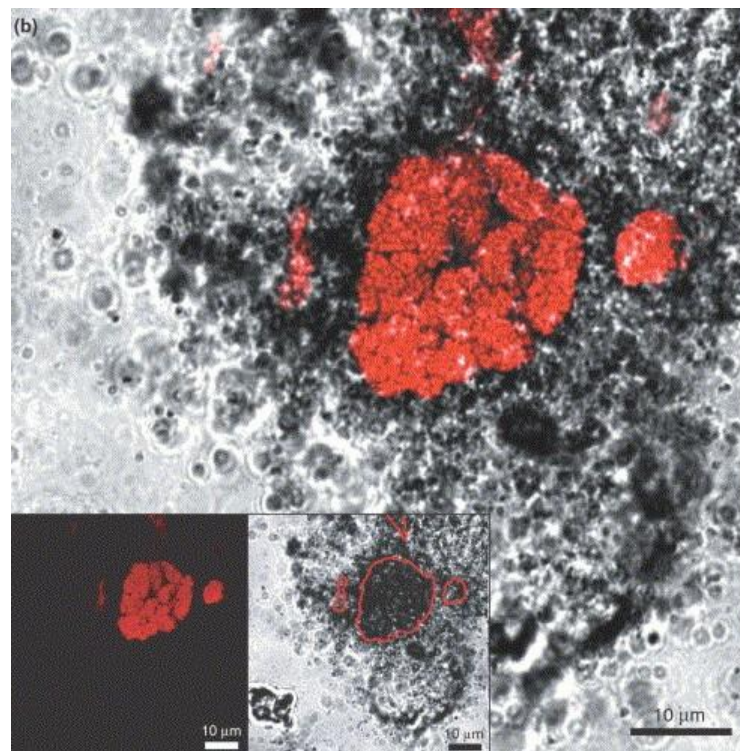


Figura 14. Organismos *Nitrospira* encontrados en aguas residuales con MAR-FISH (Wagner y Loy 2002).

1.5.1.3 Phylum *Proteobacteria*

Stackebrandt *et al.*, (1988), usando la secuencia de 16S rRNA, definieron a las purple bacteria (un grupo aparentemente no relacionado entre sí) como *Proteobacteria*.

El phylum *Proteobacteria* es el más grande y más diverso fisiológicamente de todo el dominio Bacteria. Éstas comprenden 5 grupos con varios géneros cada uno. Éstos están designados por las letras griegas alfa (α), beta (β), gama (γ), delta (δ) y épsilon (ϵ). Fisiológicamente, las *Proteobacteria* α , β y γ son grupos con muchos géneros o taxones que son fotótrofos, quimiolitótrofos o quimioorganótrofos. En las δ y ϵ no se han encontrado fotótrofos. Todas las bacterias del phylum *Proteobacteria* son Gram negativas. (Madigan *et al.*, 2004).

Emerson *et al.*, (Emerson *et al.*, 2007) basándose en la filogenética y datos fisiológicos, propusieron el primer cultivo representativo de una nueva clase de *Proteobacteria*, la Dseta (ζ)-*Proteobacteria*. El organismo perteneciente a este nuevo grupo propuesto es *Candidatus Mariprofundus ferrooxydans*, *gen. Nov., sp.nov.*, bacteria filamentosa con dependencia obligada a crecer con hierro en condiciones aerobias y en ambientes marinos (Emerson *et al.*, 2007).

1.5.1.3.1 *Alphaproteobacteria*

El grupo de las α -*Proteobacteria* es uno de los mayores grupos dentro del dominio bacterias. Este grupo incluye numerosas bacterias fotótrofas y quimiótrofas (Kersters *et al.*, 2006).

La mayoría de las “bacterias rojas no del azufre” aisladas hasta la fecha son α -*Proteobacteria*. Algunas de estas bacterias pueden crecer anaeróbicamente en la oscuridad utilizando la fermentación o la respiración anaerobia. Bajo estas condiciones el donador de electrones puede ser un compuesto orgánico o incluso en algunas especies un compuesto inorgánico como el H_2 . Sin embargo, este grupo tiene la capacidad de practicar la fotoheterotrofia (donde la luz es la fuente de energía y un compuesto orgánico es la fuente de carbono) (Madigan *et al.*, 2004). Las α -*Proteobacteria* son un grupo muy diverso nutricionalmente, pueden utilizar compuestos como ácidos grasos u orgánicos así como aminoácidos, azúcares, alcoholes, e incluso, compuestos aromáticos tales como benzoato. La mayoría pueden crecer también fotoautotróficamente con ($CO_2 + H_2$) o ($CO_2 +$ bajos niveles de H_2S) (Madigan *et al.*, 2004).

Las *Rhizobias* son bacterias con la habilidad de fijar nitrógeno atmosférico en una relación de simbiosis con plantas (Garg *et al.*, 2007; Dini *et al.*, 2009). Dentro de este orden podemos encontrar a *Nitrobacter*, organismos que suele encontrarse en las EDAR. Estos organismos participan en la nitrificación en los tratamientos de aguas residuales.

En el grupo de las α -*Proteobacteria* encontramos 6 órdenes: *Rhodospirillales*, *Rickettsiales*, *Rhodobacterales*, *Sphingomonadales*, *Caulobacterales* y las *Rhizobiales* (Garrity *et al.*, 2001).

En la figura 15 podemos ver a un grupo de α -*Proteobacteria* en muestras de un reactor MBR. Las bacterias que se visualizan son del orden *Rhodospirillales* (células en amarillo).

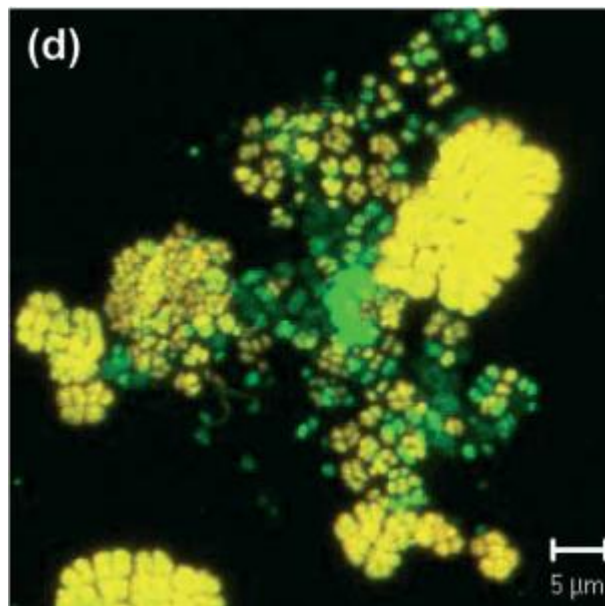


Figura 15. *Alphaproteobacteria* encontradas con FISH en muestras de un reactor MBR. Las células en verde bacterias hibridadas con EUBmix. Las células en amarillo son *Alphaproteobacteria* hibridadas con TFO_DF 218, 618 y 862 más ALF968 (Wong *et al.*, 2004).

1.5.1.3.2 *Betaproteobacteria*

Las β -*Proteobacteria* son bacterias con metabolismos muy variados como las quimioautótrofas (capaces de utilizar compuestos inorgánicos como fuente de energía). Este grupo es muy importante en el ciclo del nitrógeno, fósforo, sulfuro y carbono.

Las β -proteobacteria están subdivididas en 6 ordenes, *Burkholderiales*, *Hydrogenophiles*, *Methilophilales*, *Neisseriales*, *Nitrosomonadales* y *Rhodocyclales* (Garrity *et al.*, 2001).

En la figura 16 se puede ver bacterias β -Proteobacteria dentro de una muestra de un proceso de eliminación de fósforo, conocido por sus siglas EBPR (Enhanced Biological Phosphorus Removal).

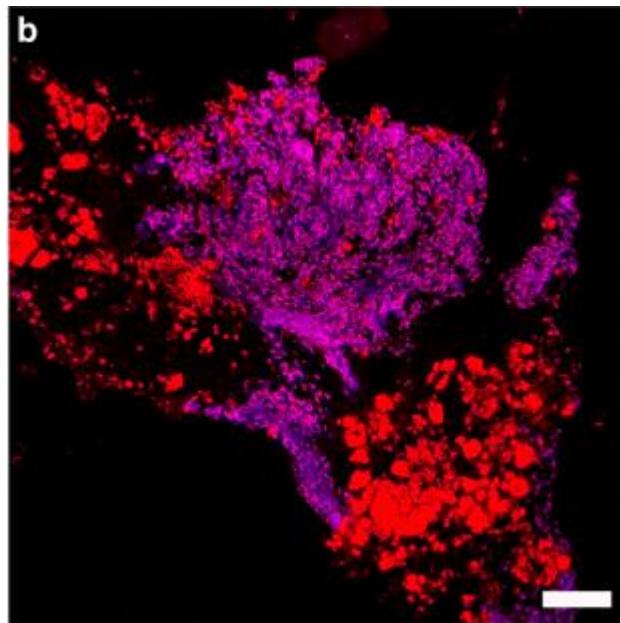


Figura 16. *Betaproteobacteria* encontradas con FISH en un proceso EBPR. Las bacterias en Rojo son hibridadas con la sonda Bet42a más su competidora (Gam42 y Gam42_C1033). Las células en Fucsia (magenta) es la fusión de Bet42a y PAOmix (Barr *et al.*, 2010).

1.5.1.3.3 *Gammaproteobacteria*

Este grupo de bacterias que taxonómicamente está en el rango de clase dentro del phylum *Proteobacteria*, es el más rico de géneros de bacterias con excepción el phylum *Firmicutes* (Garrity *et al.*, 2004).

Los miembros de γ -Proteobacteria presentan un amplio rango de aerobividad, adaptación a la temperatura y trofismo, incluyendo quimioautotrofismo y fotoautotrofismo (Scott *et al.*, 2006).

En las γ -Proteobacteria podemos encontrar 14 órdenes diferentes, *Chromatiales*, *Acidithiobacillales*, *Xanthomonadales*, *Cardiobacteriales*, *Thiotrichales*,

Legionellales, Methylococcales, Oceanspirillales, Pseudomonadales, Alteromonadales, Vibrionales, Aeromonadales, Enterobacteriales y Pasteurellales (Garrity *et al.*, 2001).

En la figura 17 se puede ver a las γ -*Proteobacteria* que se encontraron en una muestra procedente de un reactor diseñado para la desnitrificación de un acuario, el reactor es alimentado con metanol.

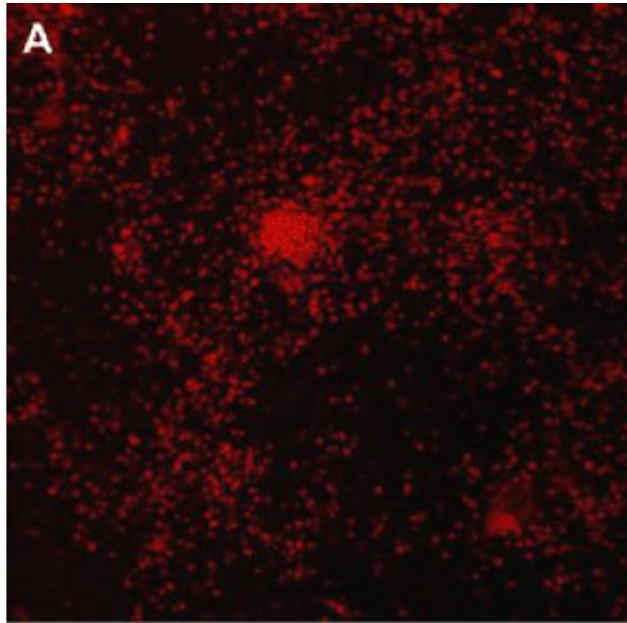


Figura 17. *Gammaproteobacteria* en muestra de un reactor desnitrificante. La sonda utilizada es GAM42a más su competidora. La técnica utilizada es MAR-FISH (Labbé *et al.*, 2007).

1.5.1.3.4 *Deltaproteobacteria*

Las δ -*Proteobacteria* tienen la particularidad de incluir algunos microorganismos que son predadores de otras bacterias. Las bacterias de este grupo contribuyen de modo importante al ciclo del azufre.

Este grupo tiene 7 órdenes: *Desulfurellales*, *Desulfovibrionales*, *Desulfobacterales*, *Desulfutomonadales*, *Syntrophobacterales*, *Bdellovibrionales* y *Myxococcales* (Garrity *et al.*, 2001). En los órdenes *Desulfovibrionales*, *Desulfobacterales* se encuentran la mayoría de los organismos sulfato reductores. Los miembros del orden *Desulfovibrionales* son bacterias anaerobias estrictas que reducen el azufre y que utilizan formas oxidadas del azufre, como los sulfatos o azufre elemental, en lugar de oxígeno como aceptor de electrones. El producto de esta reducción es el sulfuro de hidrógeno. (Tortosa *et al.*, 2007). El género mejor estudiado de las bacterias que reducen el azufre es *Desulfovibro*. Las bacterias que reducen el

azufre o sulfatos utilizan compuestos orgánicos como dadores de electrones. En el orden *Bdellovibrionales* encontramos a un género que es particularmente interesante, *Bdellovibrio*. Estos pequeños organismos vibroides poseen la singularidad de parasitar a otras bacterias, utilizando sus nutrientes citoplasmáticos como base de su sustento (Madigan *et al.*, 2004; Tortosa *et al.*, 2007).

En la figura 18 se puede ver bacterias pertenecientes a la clase δ -*Proteobacteria* halladas en un digestor anaerobio.

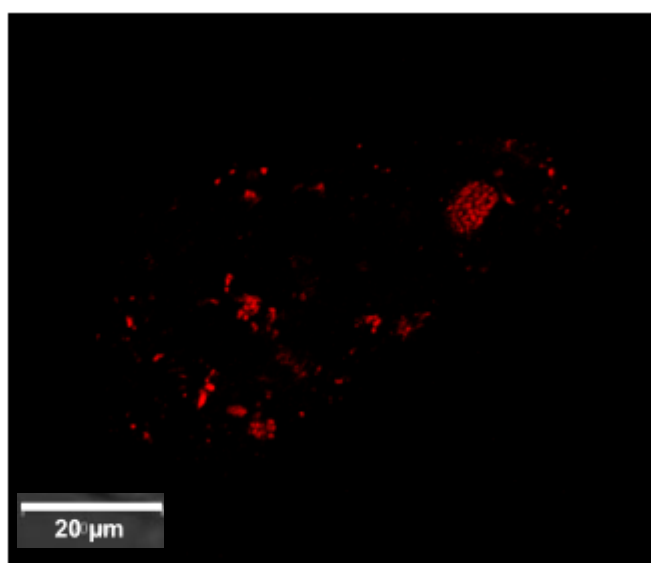


Figura 18. *Deltaproteobacteria* en un digestor anaerobio. La técnica utilizada FISH con la sonda Delta495 mix (Lücker *et al.*, 2007).

1.5.1.3.5 *Epsilonproteobacteria*

Las ϵ -*Proteobacteria* son bacilos Gram negativas delgados, helicoidales o vibrioides. Vibrioide es un término aplicado a las bacterias helicoidales que no presentan un giro completo (Tortosa *et al.*, 2007). En este grupo solo hay un orden, *Campylobacteres* (Garrity *et al.*, 2001).

Encontramos dos géneros importantes:

- *Campylobacter*
- *Helicobacter*

Estos dos géneros son organismos patógenos para el ser humano y otros animales.

En la figura 19 podemos observar a un género perteneciente a la clase ϵ -*Proteobacteria* encontradas en aguas residuales.

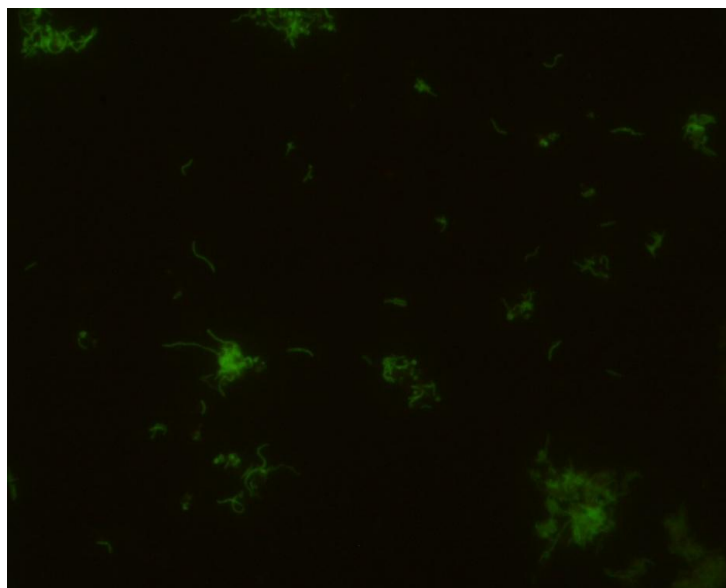


Figura 19. *Epsilonbacteria* en aguas residuales. La técnica utilizada DVC-FISH (Moreno *et al.*, 2012).

1.5.1.4 Phylum *Firmicutes*

En este grupo encontramos tres clases de bacterias: *Clostridia*, *Mollicutes* y *Bacilli* (Garrity *et al.*, 2001). Los organismos *Clostridios* (clase *Clostridia*) carecen de sistemas citocrómicos y de mecanismos de fosforilación por transporte de electrones; por tanto obtienen su energía solamente por fosforilación de sustrato y son fermentadores (Madigan *et al.*, 2004). Diversos *Clostridios* fermentan los azúcares para producir ácido butírico como producto final; otras producen también acetona y butanol. Algunos representantes de este grupo son capaces de fijar nitrógeno, como *C. pasteurianum*, el cual probablemente es el responsable de la mayor parte del nitrógeno fijado en anaerobiosis en el suelo (Madigan *et al.*, 2004). Existe un grupo de *Clostridium* que fermenta la celulosa con la formación de ácidos y alcoholes, de modo que se piensa que en anaerobiosis estos organismos son los principales implicados en la degradación de la celulosa. Otro grupo de *Clostridios* obtiene su energía por la fermentación de aminoácidos, siendo los productos generalmente acetato, butirato, CO₂ y H₂. Muchos de los productos de las fermentaciones de los *Clostridios* son malolientes (Madigan *et al.*, 2004).

Uno de los organismos mejor conocidos de este grupo es el género *Clostridium*, que es un organismo anaerobio estricto, Gram positiva y con morfología bacilar. En los fangos activos es posible encontrar *Firmicutes* tales como *Clostridium* (clase

Clostridia), *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y bacterias *Lactobacillales* (clase *Bacilli*) (Sanapareddy *et al.*, 2009; McLellan *et al.*, 2010).

Muchas especies de *Bacillus* producen enzimas extracelulares, como hidrolasas que rompen polisacáridos complejos, ácidos nucleicos o ácidos grasos hasta unidades asimilables por las células. Los productos generados sirven como fuente de carbono y donadores de electrones (Madigan *et al.*, 2004).

Staphylococcus es un organismo anaerobio facultativo y produce ácidos de la glucosa tanto en aerobiosis como en anaerobiosis (Madigan *et al.*, 2004).

Streptococcus contiene una amplia variedad de especies homofermentativas con hábitats muy diversos (Madigan *et al.*, 2004).

Las bacterias *Lactobacillales* son bacilos o cocos Gram positivas que originan ácido láctico como producto de la fermentación. Estos organismos no son sensibles al O₂ y pueden crecer tanto en presencia como en ausencia de él, por eso se les considera anaerobios aerotolerantes (Madigan *et al.*, 2004). En este grupo de bacterias se puede encontrar bacterias homofermentativas que producen solamente ácido láctico o también heterofermentativas que producen otros compuestos como etanol y CO₂.

Según la taxonomía de Bergey (Garrity *et al.*, 2001) algunas *Firmicutes* que se pueden hallar en muestras de aguas residuales (García J. L, 1991; Maixner *et al.*, 2008) son:

Phylum	<i>Firmicutes</i>
Clase	<i>Clostridia</i>
Orden	<i>Clostriales</i>
Familia	<i>Clostridiaceae</i>
Género	<i>Clostridium</i>
Género	<i>Acetivibrio</i>
Género	<i>Sarcina</i>
Familia	<i>Lachnospiraceae</i>
Género	<i>Butyrivibrio</i>
Género	<i>Ruminococcus</i>
Familia	<i>Eubacteriaceae</i>
Género	<i>Eubacterium</i>
Género	<i>Acetobacterium</i>
Familia	<i>Peptococcaeae</i>
Género	<i>Peptococcus</i>
Género	<i>Anaerovibrio</i>

	Género	<i>Desulfotomaculum</i>
	Familia	<i>Acidaminococcaceae</i>
	Género	<i>Acidaminococcus</i>
	Género	<i>Megasphaera</i>
	Género	<i>Sporomusa</i>
	Género	<i>Veillonella</i>
	Familia	<i>Syntrophomonadaceae</i>
	Género	<i>Syntrophomonas</i>
	Género	<i>Syntrophospora</i>
Orden		<i>Thermoanaerobacteriales</i>
	Familia	<i>Thermoanaerobacteriaceae</i>
	Género	<i>Thermoanaerobacterium</i>
	Género	<i>Thermoanaerobacter</i>
Orden		<i>Haloanaerobiales</i>
	Familia	<i>Halobacteroidaceae</i>
	Género	<i>Acetohalobium</i>
Clase		<i>Bacilli</i>
Orden		<i>Bacillales</i>
	Familia	<i>Bacillaceae</i>
	Género	<i>Bacillus</i>
	Género	<i>Exiguobacterium</i>
	Familia	<i>Listeriaceae</i>
	Género	<i>Listeria</i>
	Familia	<i>Staphylococcaceae</i>
	Género	<i>Staphylococcus</i>
Orden		<i>Lactobacillales</i>
	Familia	<i>Lactobacillaceae</i>
	Género	<i>Lactobacillus</i>
	Familia	<i>Enterococcaceae</i>
	Género	<i>Enterococcus</i>
	Familia	<i>Streptococcaceae</i>
	Género	<i>Streptococcus</i>
	Familia	<i>Incertae sedis</i>
	Género	<i>Acetoanaerobium</i>

En la figura 20 se puede ver una hibridación FISH de algunas *Firmicutes* en una muestra de un bioreactor.

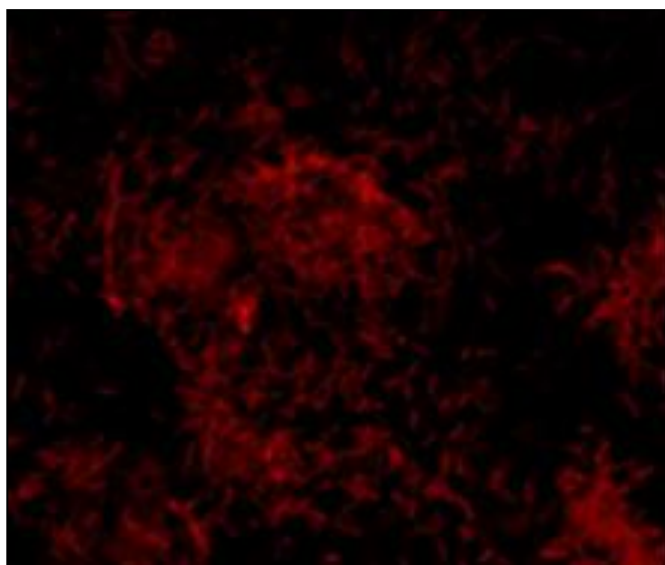


Figura 20. *Firmicutes* en una biopelícula de un reactor anaerobio. Figura capturada con un microscopio confocal de fluorescencia (Sikora *et al.*, 2013).

1.5.1.5 Phylum *Actinobacteria*

Algunos de los organismos del phylum *Actinobacteria* que están presentes en fangos activos de las EDAR, se describen a continuación:

En primer lugar se describen los *Actinomicetos*. Éstos son un grupo de microorganismos filamentosos Gram positivas cuyo crecimiento es en forma de red llamada micelio.

El género *Actinomyces* es un organismo aerobio facultativo que en los fangos activos forma microcolonias filamentosas.

Los organismos del género *Mycobacterium* son bacilos que en algún momento de su ciclo biológico tienen la propiedad de ser ácido-alcohol resistentes. Esta propiedad es debida a la presencia en la superficie de la *mycobacteria* de unos componentes lipídicos únicos denominados ácidos micólicos que solo se encuentra en este género. La mayor parte de estas bacterias tienen requerimientos nutricionales simples y bajo ciertas circunstancias pueden tener crecimiento ramificado.

El género *Propionibacterium* es anaerobio y fermentan el ácido láctico, carbohidratos y diversos alcoholes, produciendo primeramente ácido propiónico, CO₂ y ácido acético. Sus requerimientos nutricionales son complejos y normalmente presentan crecimiento lento. *Propionibacterium* también fermenta lactato con la

producción de propionato, acetato y CO₂. Esta fermentación es de interés ya que el lactato es el producto final de muchas bacterias.

Streptomyces es un género que representa una gran variedad de especies. Son bacterias filamentosas y su crecimiento ocurre en el extremo de las hifas y va acompañado de ramificación.

Es posible encontrar muchos géneros de *Actinobacteria* en las aguas residuales (García J. L, 1991, GBS, 2008 y Maixner *et al.*, 2008).

A continuación se nombran algunos géneros que se encuentran en las aguas residuales (Garrity *et al.*, 2001):

Phylum	<i>Actinobacteria</i>
Clase	<i>Actinobacteria</i>
Subclase	<i>Actinobacteridae</i>
Orden	<i>Actinomycetales</i>
Suborden	<i>Actinomycineae</i>
Familia	<i>Actinomucetaceae</i>
Género	<i>Actinomyces</i>
Suborden	<i>Micrococcineae</i>
Familia	<i>Micrococcaceae</i>
Género	<i>Micrococcus</i>
Género	<i>Arthrobacter</i>
Familia	<i>Brevibacteriaceae</i>
Género	<i>Brevibacterium</i>
Familia	<i>Intrasporangiaceae</i>
Género	<i>Janibacter</i>
Género	<i>Nostocoida</i>
Suborden	<i>Corynebacterineae</i>
Familia	<i>Corynebacteriaceae</i>
Género	<i>Corynebacterium</i>
Familia	<i>Gordoniaceae</i>
Género	<i>Gordonia</i>
Familia	<i>Mycobacteriaceae</i>
Género	<i>Mycobacterium</i>
Familia	<i>Nocardiaceae</i>
Género	<i>Nocardia</i>
Género	<i>Rhodococcus</i>
Suborden	<i>Propionibacterineae</i>
Familia	<i>Propionibacteriaceae</i>

Género *Propionibacterium*
Familia *Nocardioideae*
Género *Nocardioides*
Suborden *Pseudonocardineae*
Familia *Pseudonocardiaceae*
Género *Saccharopolyspora*
Suborden *Streptomycineae*
Familia *Streptomycetaceae*
Género *Streptomyces*
Suborden *Frankineae*
Familia *Frankiaceae*
Género *Frankia*
Familia *Kineosporiaceae*
Género *Kineococcus*
Orden *Bifidobacteriales*
Familia *Bifidobacteriaceae*
Género *Bifidobacterium*

En la figura 21 podemos observar células de *Actinobacteria* en un sistema de fangos activos con proceso de eliminación biológica de fósforo.

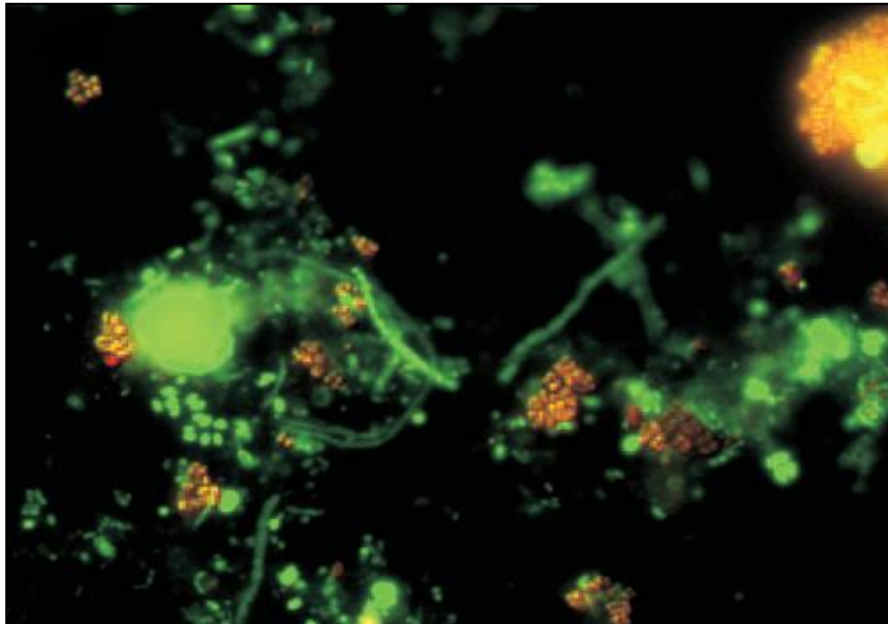


Figura 21. *Actinobacteria* en fangos activos con proceso de eliminación de fósforo. Las células en naranja (combinación del canal rojo con el verde) son las *actinobacterias* y las células en verde son bacterias hibridadas con EUBMIX con MAR-FISH (Kong *et al.*, 2005).

1.5.1.6 Phylum *Planctomycetes*

El interés por los miembros de este grupo radica en que carecen de peptidoglucano y sus paredes celulares son del tipo capa S, formada por una proteína que contiene grandes cantidades de cisteína y prolina (Madigan *et al.*, 2004). El organismo de este phylum mejor estudiado es *Planctomyces*. Esta bacteria es quimioorganotrofo aerobio facultativo que crece con fermentación (Madigan *et al.*, 2004).

Con el uso de las técnicas moleculares se están ampliando los conocimientos que se tienen de los *Planctomycetes* (Fuerst, 2004). Se tiene 4 géneros cultivados dentro de este phylum, pero existe una gran diversidad de estos organismos entre los que hay aerobios facultativos, anaerobios obligados y autótrofos (Zhang *et al.*, 2012).

Un grupo definido, *planctomycetes 'anammox'*, comprende al menos 3 géneros Candidatos ("*Brocadia*", "*Kuenenia*" y "*Scalindua*") (Kuenen *et al.*, 2001; Schmid *et al.*, 2000; Schmid *et al.*, 2003). Estos organismos fueron encontrados en biorreactores anammox (Strous *et al.*, 1999; Schmid *et al.*, 2003).

Se tiene conocimiento de que en el tratamiento de aguas residuales son diversos los representantes de los *planctomyces* (Chouari *et al.*, 2003). Algunos de los organismos que se pueden encontrar en los fangos activos son (Garrity *et al.*, 2001):

Phylum	<i>Planctomycetes</i>
Clase	<i>Planctomycetacia</i>
Orden	<i>Planctomycetales</i>
Familia	<i>Planctomycetaceae</i>
Género	<i>Plantomyces</i>
Género	<i>Gemmata</i>
Género	<i>Isosphaera</i>
Género	<i>Pirella</i>

La figura 22 muestra una hibridación de un fango activado del phylum *Planctomycetes*; la sonda utilizada es PLA46 y PLA46R (Chouari *et al.*, 2003).

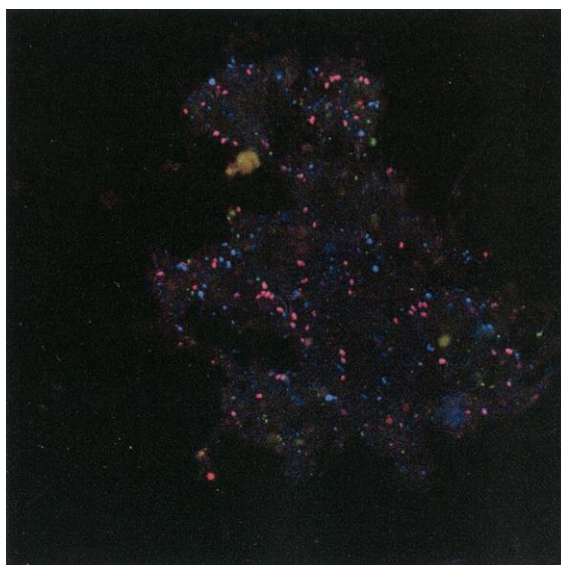


Figura 22. *Planctomycetes* en fangos activos aerobios. Las células azules y rosadas con bacterias *Planctomycetales* identificadas por FISH con la sonda PLA46 y PLA46R (Chouari *et al.*, 2003).

1.5.1.7 Phylum *Acidobacteria*

El phylum *Acidobacteria* fue identificado por primera vez en 1997 en muestras de suelo agrícola por la secuenciación del 16S rRNA (Ludwig *et al.*, 1997). En diversos entornos se ha recuperado secuencias de estos organismos, incluyendo suelo, agua de mar, aguas termales y drenajes ácidos de minas (Hugenholtz *et al.*, 1998a; Barns *et al.*, 1999; Sait *et al.*, 2002).

Las *Acidobacterias* previamente fueron divididas en ocho subgrupos profundamente ramificados (Hugenholtz *et al.*, 1998b) pero en otro estudio se amplió a once subgrupos (Zimmermann *et al.*, 2005).

También se ha hallado *Acidobacterias* en biorreactores en sistemas de tratamiento de aguas para farmacéuticas (LaParra *et al.*, 2000), y en tratamientos de aguas urbanas (Maixner *et al.*, 2008; Sanapareddy *et al.*, 2009).

El phylum *Acidobacteria* se compone de los siguientes géneros cultivables (Garrity *et al.*, 2004):

Phylum	<i>Acidobacteria</i>
Clase	<i>Acidobacteria</i>
Orden	<i>Acidobacteriales</i>
Familia	<i>Acidobacteraceae</i>
Género	<i>Acidobacterium</i>

Especie	<i>Acidobacterium capsulatum</i>
Género	<i>Geothrix</i>
Especie	<i>Geotrix fermentans</i>
Género	<i>Holophaga</i>
Especie	<i>Holophaga foetida</i>

En la figura 23 se puede observar *Acidobacterias* halladas en muestras tomadas en aguas subterráneas en un acuífero de Estados Unidos de América.

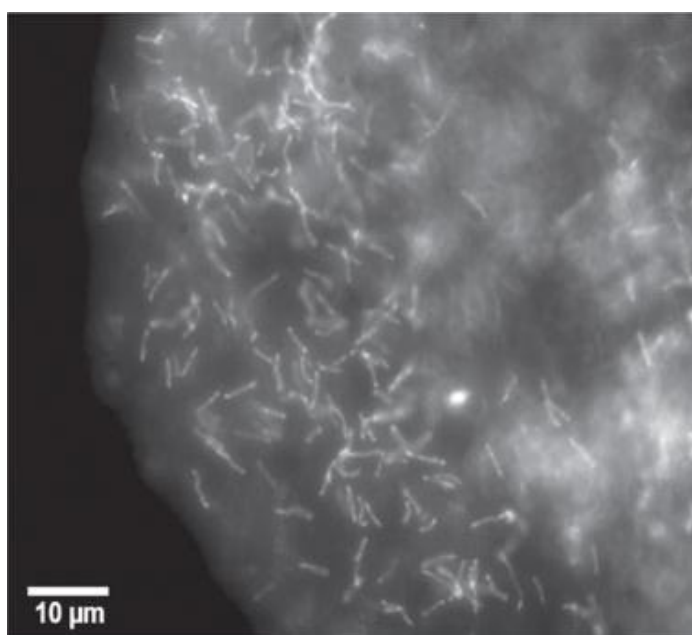


Figura 23. Colonia de *Acidobacteria* en una muestra extraída en un acuífero en EEUU (Meisinger *et al.*, 2007).

1.5.1.8 Phylum *Bacteroidetes*

Este phylum de bacteria comprende una mezcla de diferentes tipos fisiológicos de organismos y diversos hábitats, tales como, bacterias aerobias, anaerobias estrictas y anaerobias facultativas (Madigan *et al.*, 2004).

Entre los miembros de este phylum que se pueden encontrar en los fangos activos están:

Bacteroides. Son organismos anaerobios estrictos no esporulados y sacarolíticos que fermentan hasta principalmente acetato y succinato (Madigan *et al.*, 2004).

Flavobacterium. Se encuentran en medios acuáticos tanto en agua dulce como salada así como en alimentos y en plantas procesadoras de los mismos. Tienen restringido el número de fuentes de carbono que pueden utilizar, siendo la glucosa su fuente principal (Madigan *et al.*, 2004).

También dentro de este phylum encontramos a un grupo con forma bacilar alargada o células largas y con movimiento de deslizamiento, estos son: *Cytophaga*, *Sporocytophaga* y *Flexibacter* (Madigan *et al.*, 2004).

Cytophaga y *Sporocytophaga*. Son organismos aerobios obligados y probablemente las bacterias responsables de la degradación de la celulosa en medios aerobios (Madigan *et al.*, 2004).

Flexibacter. Organismos no celulolíticos que forman filamentos en los fangos activos y se le atribuye turbidez en el clarificado (GBS, 2008).

La taxonomía de algunos organismos de este phylum es (Garrity *et al.*, 2004):

Phylum	<i>Bacteroidetes</i>
Clase	<i>Bacteroidetes</i>
Orden	<i>Bacteroidales</i>
Familia	<i>Bacteroidaceae</i>
Género	<i>Bacteroides</i>
Clase	<i>Flavobacteria</i>
Orden	<i>Flavobacteriales</i>
Familia	<i>Flavobacteriaceae</i>
Género	<i>Flavobacterium</i>
Clase	<i>Shingobacteria</i>
Orden	<i>Shingobacteriales</i>
Familia	<i>Flexibacteraceae</i>
Género	<i>Flexibacter</i>
Género	<i>Cytophaga</i>
Género	<i>Sporocytophaga</i>

1.5.2 Grupos Funcionales Bacterianos

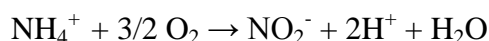
Bacterias de diferentes phylum o clase pueden formar grupos con características fenotípicas en común. Los principales grupos de interés en el tratamiento de aguas residuales son los que participan en la degradación del carbono, hidrógeno, nitrógeno, fósforo y azufre.

Se describirán algunos de los grupos de bacterias que llevan a cabo la degradación de un sustrato o contaminante en común y que juegan un papel importante en los tratamientos de las aguas residuales.

1.5.2.1 Bacterias Nitrificantes

Un grupo muy limitado de microorganismos autótrofos (bacterias nitrificantes) lleva a cabo el proceso de la nitrificación. La nitrificación consiste en la oxidación del amonio a nitrato mediante dos pasos. El primer paso lo realizan bacterias quimiolitautotrofas amonio oxidantes (AOB), seguido por la oxidación a nitrato por las bacterias quimiolitautotrofas nitrato oxidantes (NOB) (Daims *et al.*, 2001).

El primer paso consiste en oxidar el amonio a nitrito, cuya reacción es (Ferrer *et al.*, 2007):

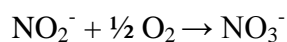


Algunos de los organismos que realizan este primer paso y se han hallado en el tratamiento de aguas residuales son: *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrosovibrio* y *Nitrosobulus* (Yu *et al.*, 2011).

La clasificación taxonómica de estas bacterias (AOB) basada en el manual Bergey (Garrity *et al.*, 2004) es la siguiente:

Phylum	<i>Proteobacteria</i>
Clase	<i>β-Proteobacteria</i>
Orden	<i>Nitrosomonadales</i>
Familia	<i>Nitrosomonadaceae</i>
Género	<i>Nitrosomonas</i>
Género	<i>Nitrosolobus</i>
Género	<i>Nitrospira</i>
Clase	<i>γ-Proteobacteria</i>
Orden	<i>Chromatiales</i>
Familia	<i>Chromatiaceae</i>
Género	<i>Nitrosococcus</i>

El segundo paso consiste en la oxidación de nitrito a nitrato. La reacción que se lleva a cabo es (Ferrer *et al.*, 2007):



El grupo de bacterias que participan en este paso son las NOB. Algunos géneros encontrados en el tratamiento de aguas residuales son: *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina* y *Nitrospira* (Daims *et al.*, 2001).

La clasificación taxonómica de las NOB mencionadas es la siguiente (Garrity *et al.*, 2004):

Phylum *Nitrospira*
Clase *Nitrospira*
Orden *Nitrospirales*
Familia *Nitrospiraceae*
Género *Nitrospira*

Phylum *Proteobacteria*
Clase *α -Proteobacteria*
Orden *Rhizobiales*
Familia *Bradyrhizobiaceae*
Género *Nitrobacter*

Clase *γ -Proteobacteria*
Orden *Chromatiales*
Familia *Ectothiorhodospiraceae*
Género *Nitrococcus*

Clase *δ -Proteobacteria*
Orden *Desulfobacterales*
Familia *Nitrospinaceae*
Género *Nitrospina*

Las bacterias nitrificantes se caracterizan por una baja tasa de crecimiento, debido a la poca energía obtenida durante la nitrificación (Teira *et al.*, 1996).

1.5.2.2 Bacterias Desnitrificantes

El proceso de desnitrificación implica la reducción de nitrato a nitrógeno gas por las bacterias anaerobias facultativas que utilizan nitrato como aceptor de electrones.

Las bacterias desnitrificantes son filogenéticamente diversas y están distribuidas ampliamente en ecosistemas acuáticos y terrestres. Estas generalmente son heterótrofas que utilizan el carbono de la materia orgánica para la síntesis celular y como fuente de energía (Fernández *et al.*, 2008). También existen las bacterias

desnitrificantes autótrofas; éstas utilizan compuestos de azufre reducido (S^2 , S^0 , $S_2O_3^{2-}$, $S_4O_6^{2-}$, SO_3^{2-}), en lugar de compuestos orgánicos para la reducción del nitrato (Lee *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2004).

Los típicos géneros desnitrificantes organotróficos de los sistemas de fangos activos son: *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Hypomicrobium*, *Moraxella* y *Pseudomonas* (Wanner J., 1994). Sin embargo la estructura de la comunidad de bacterias desnitrificantes se ve afectada por las diversas fuentes de carbono (Ginige *et al.*, 2004; Ginige *et al.*, 2005; Hallin *et al.*, 2006; Osaka *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2013).

Se sospechaba que en las plantas de fangos activos para la eliminación de materia orgánica, nitrificación y desnitrificación, dominaban entre las desnitrificantes la β -*Proteobacteria* del género *Aquaspirillus*, seguidas de las *Thauera* y *Azoarcus* (Thomsen *et al.*, 2007). Sin embargo se ha observado que el género *Zoogloea* junto con *Azoarcus* y *Thauera* abundan y se cree que son las dominantes en la desnitrificación de las plantas de tratamiento industrial (Juretschko *et al.*, 2002). Según diversos estudios las β -*Proteobacteria* del género *Dechloromonas* y *Thauera* son las bacterias desnitrificantes dominantes en fangos activos con metanol (Ginige *et al.*, 2004) y acetato (Ginige *et al.*, 2005) respectivamente. Se conocen otras β -*Proteobacteria* capaces de desnitrificar en el tratamiento de fangos activos, como son *Comamonadaceae* y algunas α -*Proteobacteria Rhodobacteraceae* (Osaka *et al.*, 2006).

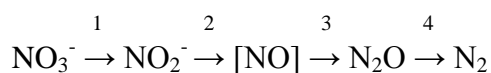
Se ha utilizado cultivos puros de *Thiobacillus desnitificans* y *Paracoccus* para estudiar la desnitrificación en presencia de azufre y tiosulfato como donadores de electrones (Lee, *et al.*, 2008). *Thiobacillus desnitificans* es capaz de crecer como anaerobios facultativos quimiolitotrofos, y es capaz de oxidar compuestos inorgánicos de azufre, nitrato y otros compuestos nitrogenados (Lee, *et al.*, 2008).

La mayoría de las bacterias desnitrificantes pertenecen al phylum *Proteobacteria* (Shen *et al.*, 2013). La taxonomía de algunas de las bacterias desnitrificantes dentro del phylum *Proteobacteria* (Garrity, *et al.*, 2001) es la siguiente:

Phylum	<i>Proteobacteria</i>
Clase	α - <i>Proteobacteria</i>
Orden	<i>Rhodobacterales</i>
Familia	<i>Rhodobacteraceae</i>
Género	<i>Paracoccus</i>
Orden	<i>Caulobacterales</i>
Familia	<i>Caulobacteraceae</i>
Género	<i>Caulobacter</i>

	Género	<i>Brevundimonas</i>
	Familia	<i>Hyphomicrobiaceae</i>
	Género	<i>Hyphomicrobium</i>
Clase	<i>β-Proteobacteria</i>	
Orden	<i>Hydrogenophilales</i>	
	Familia	<i>Alcaligenaceae</i>
	Género	<i>Alcaligenes</i>
	Género	<i>Achromobacter</i>
	Familia	<i>Comamonadaceae</i>
	Género	<i>Acidovorax</i>
	Género	<i>Alicyclophilus</i>
	Género	<i>Diaphorobacter</i>
Orden	<i>Hydrogenophilales</i>	
	Familia	<i>Hydrogenophilaceae</i>
	Género	<i>Thiobacillus</i>
Orden	<i>Neisseriales</i>	
	Familia	<i>Neisseriales</i>
	Género	<i>Aquaspirillum</i>
Orden	<i>Rhodocyclales</i>	
	Familia	<i>Rhodocyclaceae</i>
	Género	<i>Azoarcus</i>
	Género	<i>Dechloromonas</i>
	Género	<i>Thaurea</i>
	Género	<i>Zoogloea</i>
Clase	<i>γ-Proteobacteria</i>	
Orden	<i>Pseudomonadaceae</i>	
	Familia	<i>Pseudomonadaceae</i>
	Género	<i>Pseudomonas</i>
Clase	<i>δ-Proteobacteria</i>	
Orden	<i>Bdellovibrionales</i>	
	Familia	<i>Bdellovibrionaceae</i>
	Género	<i>Bdellovibrio</i>

Las bacterias desnitrificantes llevan a cabo las reacciones por vía enzimática (Adav *et al.*, 2010). Éstas son:

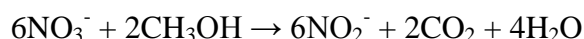


1. Enzima nitrato reductasa
2. Enzima nitrito reductasa

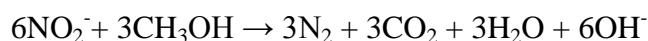
3. Enzima óxido nítrico reductasa
4. Enzima óxido nitroso reductasa

La reacción de reducción del nitrato a nitrógeno gas utilizando metanol como fuente de carbono puede representarse de la siguiente manera (Ferrer *et al.*, 2007):

Primera fase:



Segunda fase:



1.5.3 Bacterias acumuladoras de poli-fosfatos (PAO)

La eliminación biológica de fósforo es llevada a cabo por un grupo de bacterias denominadas PAO (Polyphosphate Accumulating Organisms) capaces de captar más fosfatos de lo requerido para su crecimiento. Estas bacterias liberan y toman fósforo en condiciones anaerobias y aerobias respectivamente.

En condiciones anaerobias, la materia orgánica fácilmente biodegradable es descompuesta por las bacterias acidogénicas a ácidos grasos volátiles de cadena corta. Estos ácidos grasos son absorbidos por las bacterias PAO y almacenados como Poli-Hidroxi-Butirato (PHB) y otros Poli-Hidroxi-Alcanoatos (PHA). La energía necesaria para el almacenamiento de los ácidos grasos es obtenida de la descomposición de los poli-fosfatos en condiciones anaerobias. Durante este proceso es cuando se produce la descarga de fosfatos al medio.

Bajo condiciones aerobias, las bacterias PAO pueden utilizar el sustrato almacenado (PHB) dando lugar al crecimiento de las mismas. Así mismo, utilizan parte de este sustrato almacenado para acumular fósforo intracelular en forma de poli-fosfatos, asegurando las reservas de energía necesaria para la etapa anaerobia.

En un estudio en 1994 se utilizó la técnica FISH para estudiar la comunidad microbiana en una planta de tratamiento de aguas residuales en la que se producía la eliminación biológica de fósforo (Wagner *et al.*, 1994). La población bacteriana resultó en su mayoría *Actinobacteria* y β -*Proteobacteria*, seguida de γ -*Proteobacteria*, y en menor proporción el género *Acinetobacter* (Wagner *et al.*, 1994). Al año siguiente se realizaron estudios comparando la estructura de la comunidad bacteriana de fangos con y sin eliminación de fosfatos (Bond *et al.*, 1995). En este estudio se operaron dos

reactores de laboratorio con diferentes capacidades para la eliminación de fosfatos. En ambos reactores, el grupo dominante de bacterias pertenecía a la clase β -*Proteobacteria* y dentro de esta clase, el género *Rhodocyclus* se encontraba en mayor proporción en el reactor que experimentaba mejor eliminación de fósforo.

En 1999 un estudio indicó la posición filogenética definitiva del subgrupo β -*Proteobacteria*, como muy cercano al género *Rhodocyclus*. A éste se le llamó “*Candidatus Accumulibacter Phosphatis*” (Hesselmann *et al.*, 1999). Un año más tarde se comprobó que *Accumulibacter* es capaz de realizar el tránsito de los polifosfatos en el medio (Crocetti *et al.*, 2000). Estos estudios demostraron que *Accumulibacter* correspondía con el fenotipo PAO y que predominan en los reactores tanto de laboratorio como industriales. A *Rhodocyclus* y a *Propionibacter* se le considera como PAO importante y dominante en los sistemas EBPR (Crocetti *et al.*, 2000; Zilles *et al.*, 2002).

En el año 2001 (Liu *et al.*, 2001) fue observado que miembros de *Accumulibacter phosphatis* y de un nuevo grupo de γ -*Proteobacteria* acumulan tanto polifosfatos como PHA, mientras que un grupo de cocos del género *Tetrasphaera* y de la filamentosa *Candidatus Nostoicoidia limícola* acumula polifosfatos pero no PHA. Todos estos géneros se encontraron en muestras de EBPR.

En 2004 (Kong *et al.*, 2004) encontró *Rhodocyclus* en tres plantas de tratamiento EBPR en Dinamarca, donde éste organismo fue capaz de acumular sustratos de cadena corta incluyendo acetato, propionato y piruvato en condiciones anaerobias. También constataron su capacidad de tomar ortofosfatos y acumular polifosfatos en presencia de oxígeno, nitrato o nitrito como aceptor de electrones, con lo que se le atribuye la capacidad de desnitrificar.

También se ha hallado organismos PAO pertenecientes a *Actinobacteria* (Kong *et al.*, 2005). Este estudio comprendió a 10 plantas EBPR de las cuales 6 tratan aguas domésticas 1 aguas urbanas y 3 industriales; se detectaron no solo *Rhodocyclus* si no también dos morfotipos que hibridan con la sonda de *Actinobacteria* y que participan activamente en la captación de los ortofosfatos. Ambos morfotipos se revelan en forma de cocos en grupos tétradas y grupos de bacilos cortos, pertenecientes al género *Tetrasphaera*.

En el año 2012 (Kawakoshi *et al.*, 2012) se realizó un estudio del género *Microthrix phosphovorans* y se consideró como otro candidato a PAO. Éste organismo acumula polifosfatos aeróbicamente y se ha observado previamente dos especies de PHA (Poli-Hidroxi Butirato y Poli Hidroxi Velerato) (Aker *et al.*, 2006). Sin embargo la producción de PHA en *M. phosphovorans* parece ser diferente a la de las PAO *Proteobacteria*; aparentemente *M. phosphovorans* produce PHA en

condiciones aerobias pero aun no es del todo bien conocido (Kawakoshi *et al.*, 2012). En otro estudio realizado en el 2012 (Nguyen *et al.*, 2012) se detectó que el género *Halomonas* (γ -*Proteobacteria*) participa activamente en la captación de los ortofosfatos; la toma de PHA se observó en condiciones anaerobias.

En otras 25 plantas de tratamiento EBPR aplicando la técnica FISH, se ha hallado organismos como *Tetrasphaera* y *Accumulibacter* como los dominantes del grupo PAO (Nielsen *et al.*, 2012). Aun en día la fisiología de *Tetrasphaera* es un misterio, se cree que varias especies de este género pueden desempeñar diversas funciones en las plantas EBPR de gran escala (Nielsen *et al.*, 2010).

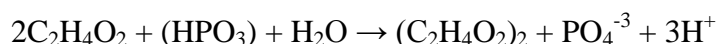
Se han desarrollado diversas sondas para detectar los principales miembros de *Accumulibacter* en las muestras de aguas residuales. Algunas de estas sondas son: PAO462, PAO651, PAO846 (Croccetti *et al.*, 2000). El uso conjunto de dichas sondas forma la sonda PAOmix que cubriría todas las secuencias conocidas de las bacterias *Accumulibacter* en las muestras de fangos activos.

La taxonomía de algunas bacterias PAO según la segunda edición del manual Bergey's (Garrity, *et al.*, 2001) es:

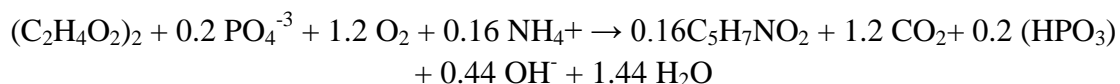
Phylum	<i>Proteobacteria</i>
Clase	β - <i>Proteobacteria</i>
Orden	<i>Rhodocyclales</i>
Familia	<i>Rhodocyclaceae</i>
Género	<i>Rhodocyclus</i>
Orden	<i>Nitrosomonadales</i>
Familia	<i>Nitrosomonadaceae</i>
Género	<i>Propionibacter</i>
Clase	γ - <i>Proteobacteria</i>
Orden	<i>Oceanspirillales</i>
Familia	<i>Halomonadaceae</i>
Género	<i>Halomonas</i>
Orden	<i>Pseudomonadales</i>
Familia	<i>Pseudomonadaceae</i>
Género	<i>Pseudomonas</i>
Phylum	<i>Actinobacteria</i>
Clase	<i>Actinobacteria</i>
Subclase	<i>Actinobacteridae</i>
Orden	<i>Actinomycetales</i>
Suborden	<i>Micrococcineae</i>
Familia	<i>Intrasporangiaceae</i>

Género *Tetrasphaera*
Suborden *Propionibacterineae*
Familia *Propionibacteriaceae*
Género *Microlunatus*
Especie *Microlunatus phosphorovus*

La reacción de la degradación de polifosfato en condiciones anaerobias es (Ferrer *et al.*, 2007):



La reacción de la toma de fosfatos en condiciones aerobias es (Ferrer *et al.*, 2007):



1.5.4 Bacterias acumuladoras de glucógeno (GAO)

Las bacterias GAO (Glycogen Accumulating Organisms) se consideran competidoras de las bacterias PAO, ya que pueden realizar transformaciones similares de carbono, pero no consumen P (Fósforo) por encima del requerido para su crecimiento (Liu *et al.*, 1996). Las GAO toman VFA (Volatile Fatty Acids) que transforman en PHA en condiciones anaerobias. El PHA es almacenado hasta el siguiente periodo aerobio donde se oxida a CO₂ y glucógeno. El glucógeno producido en el periodo aerobio les provee de energía durante el periodo anaerobio (Oehmen *et al.*, 2004).

El término GAO fue propuesto en 1995, y fue definido como el fenotipo de organismos que acumulan glucógeno aeróbicamente, y lo consumen anaeróbicamente como fuente de energía (Mino *et al.*, 1995).

Un grupo conocido como GB o por el nombre de *Candidatus competibacter phosphatis* (Crocetti *et al.*, 2000) fue considerado miembro putativo GAO (Crocetti *et al.*, 2002; Kong *et al.*, 2002). Las bacterias TFO (Tetrad-Forming Organisms) (Levantesi *et al.*, 2002), también son un grupo considerado miembros putativos GAO. Entre los representantes del grupo TFO putativos GAO están: *Shingomonadales* (Beer *et al.*, 2004), *Deffluvicoccus vanus* (Wong *et al.*, 2002) y *Dechloromonas* (Ahn *et al.*, 2007).

Existe gran diversidad filogenética entre las GAO. Este grupo está repartido entre los phylum *Proteobacteria* y *Actinobacteria*, por ejemplo: *Amaricoccus spp.* y

Defluviicoccus vanus de la clase α -*Proteobacteria*; *Dechloromonas* de la clase β -*Proteobacteria*; algunas bacterias de la clase γ -*Proteobacteria* y *actinobacteria* como *Micropruina glycogenia* y *Kinosphaera limosa* (Maszenan *et al.*, 1997; Shintani *et al.*, 2000; Kong *et al.*, 2001; Hanada *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002).

En 1999 se diseñaron dos sondas FISH (Gam1019 y Gam1278) para hibridar sobre las bacterias GAO pertenecientes a la clase γ -*Proteobacteria* (Nielsen *et al.*, 1999). Estas sondas fueron utilizadas un fango deteriorado de un proceso de eliminación de fósforo y encontraron que el 35% de la población microbiana coincidía con las bacterias GAO. Años más tarde se realizó un estudio donde se utilizó un fango muy deteriorado de un proceso de eliminación de fósforo (Crocetti *et al.*, 2002). Como resultado se diseñaron dos nuevas sondas (GAOQ431 y GAOQ989) que hibridaban sobre bacterias con fenotipo GAO pertenecientes a la clase γ -*Proteobacteria*.

En el 2002 se realizó un minucioso estudio en el que se identificó un nuevo grupo de GAO compuesto por siete subgrupos dentro de la clase de γ -*Proteobacteria* (Kong *et al.*, 2002). Como consecuencia se diseñaron 10 sondas FISH para hibridar específicamente sobre este nuevo grupo de bacterias a diferentes niveles jerárquicos: GB, la sonda para el nivel más general; GB_G1 (idéntica a GAOQ989), GB_G2 y GB_3 hasta GB_7.

Otros dos subgrupos de la clase α -*Proteobacteria* y próximos a *Defluviicoccus vanus*, han sido relacionados con el fenotipo GAO. El primero de los subgrupos comprende las bacterias que hibridan con las sondas TFO_DF218 y TFO_DF618 (Wong *et al.*, 2004). Este grupo de bacterias (*Defluviicoccus vanus Cluster 1*) mostró una importante presencia en los reactores de laboratorio, pero no en las EDAR. El segundo subgrupo correspondía con bacterias encontradas en reactores alimentados con propionato (Meyer *et al.*, 2006), conocidas como “*Defluviicoccus vanus Cluster 2*”. Las sondas diseñadas para hibridar sobre este subgrupo fueron DF988 y DF1020.

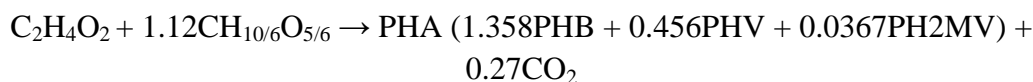
La taxonomía de algunas bacterias GAO según la segunda edición del manual Bergey's (Garrity, *et al.*, 2001) es:

Phylum	<i>Proteobacteria</i>
Clase	α - <i>Proteobacteria</i>
Orden	<i>Rhodospirillales</i>
Familia	<i>Rhodospirillaceae</i>
Género	<i>Defluviicoccus</i>
Especie	<i>Defluviicoccus vanus</i>
Orden	<i>Rhodobacterales</i>
Familia	<i>Rhodobacteraceae</i>

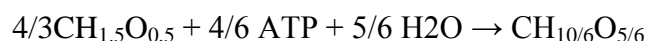
	Género	<i>Amaricoccus</i>
Clase	β - <i>Proteobacteria</i>	
Orden	<i>Rhodocyclales</i>	
	Familia	<i>Rhodocyclaceae</i>
	Género	<i>Dechloromonas</i>
Clase	γ - <i>Proteobacteria</i>	
Orden	No clasificado	
	Familia	<i>Competibacteraceae</i>
	Género	<i>Candidatus competibacter</i>
	Especie	<i>Candidatus competibacter phosphatis</i>
Phylum	<i>Actinobacteria phy. nov.</i>	
Clase	<i>Actinobacteria</i>	
Subclase	<i>Actinobacteridae</i>	
Orden	<i>Actinomycetales</i>	
	Suborden	<i>Propionibacterineae</i>
	Familia	<i>Nocardioideae</i>
	Género	<i>Micropruina</i>

Las reacciones que llevan a cabo las bacterias GAO son (Oehmen *et al.*, 2005):

En condiciones anaerobias



En condiciones aerobias



1.5.5 Bacterias acidogénicas/acetogénicas

Las bacterias acidogénicas o fermentativas producen compuestos orgánicos llamados ácidos grasos volátiles como acético, fórmico, propiónico, butírico, valérico, láctico, y otros compuestos como H₂, etanol y CO₂ (Ramírez, 1992; Zhao *et al.*, 2008).

Las FAB (Fermentative Acidogenic Bacteria) pueden ser celulolíticas, proteolíticas y lipolíticas (Ramírez, 1992). Dentro de las especies celulolíticas anaerobias más numerosas se encuentran el género *Clostridium* (tabla 2).

Las bacterias proteolíticas que principalmente se han identificado pertenecen al género *Clostridium* y otras como *Peptococcus* y *Bacteroides*.

La población bacteriana fermentativa varía mucho con el sustrato. En la Tabla 2 y tabla 3 se muestran diversas bacterias acidogénicas y sus productos.

Tabla 2. Bacterias acidogénicas hidrolíticas de la digestión Anaerobia (Ramirez, 1992)

Especie	Sustrato
<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> <i>Bacteroides succinogenes</i> <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> <i>Cillobacterium cellulosolvens</i> <i>Ruminococcus Albus</i> <i>Ruminococcus flavifaciens</i>	<i>Celulosa</i>
<i>Bacteroides ruminicola</i> <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	<i>Hemicelulosas</i>
<i>Bacillus spp.</i> <i>Bacteroides spp.</i> <i>Clostridium butyricum</i> <i>Clostridium spp.</i> <i>Lactobacillus spp.</i> <i>Micrococcus spp.</i> <i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Almidón</i>
<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Pectinas</i>
<i>Anaerovibrio lipolytica</i> <i>Bacillus spp.</i>	<i>Lípidos</i>
<i>Clostridium acidi urici</i> <i>Clostridium cylindrosporum</i> <i>Micrococcus aerogenes</i> <i>Micrococcus lactilycus</i>	<i>Compuestos nitrogenados</i>
<i>Bacillus spp.</i> <i>Clostridium spp.</i> <i>Bifidobacterium spp.</i> <i>Peptococcus anaerobus</i> <i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Proteínas</i>
<i>Termofilicas</i>	
<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>Celulosa</i>
<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	<i>Almidón y Pectinas</i>

Tabla 3. Bacterias acidogénicas fermentativas de la digestión anaerobia (Ramirez, 1992)

Especie	Metabolitos
<i>Acetobacterium woodii</i> <i>Clostridium aceticum</i> <i>Clostridium formiaceticum</i>	Acetato
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i> <i>Eubacterium sp.</i> <i>Acidaminococcus sp.</i>	Acetato, Butirato
<i>Clostridium sp.</i>	Acetato, Butirato, Etanol
<i>Propionibacterium sp.</i> <i>Anaerovibrio sp.</i> <i>Veillonella sp.</i>	Acetato, Propionato
<i>Lactobacillus sp.</i>	Acetato, Etanol, Lactato
<i>Bifidobacterium sp.</i>	Acetato, Lactato
<i>Ruminococcus sp.</i>	Acetato, Lactato, Formato
<i>Leptotrichia sp.</i> <i>Streptococcus sp.</i>	Lactato
<i>Succinivibrio sp.</i>	Succinato
<i>Butyrivibrio sp.</i> <i>Fusobacterium sp.</i>	Butirato
<i>Megasphaera</i>	Butirato, Isobutirato, Valerato, Isovalerato, Caproato
Termofílicas	
<i>Clostridium thermo-aceticum</i> <i>Acetogenium kivui</i>	Acetato
<i>Thermo-anaerobium brockii</i>	Lactato, Acetato, Etanol
<i>Thermo-bacteroides acetoethylicus</i>	Etanol, Acetato, Butirato, Isobutirato
<i>Thermo-anaerobacter ethanolicus</i>	Etanol, Acetato, Lactato, Isobutirato, Isovalerato
<i>Clostridium thermo-saccharolyticum</i>	Etanol, Acetato, Lactato, Butirato, Formato

Mientras que algunos productos de la fermentación de las FAB pueden ser metabolizados directamente por otros organismos, los demás compuestos como los ácidos grasos de más de dos carbonos como propiónico, butírico, valérico etc. deben ser sintetizados a productos más simples como acetato y H₂ a través de otro grupo de bacterias denominadas acetogénicas.

Las bacterias acetogénicas son un complejo grupo de anaerobios estrictos que utilizan la vía del acetil-CoA para reducir las emisiones de CO₂, y tienen acetato como su producto principal de la respiración (Drake *et al.*, 2002). Sin embargo hay evidencia de que hay bacterias acetogénicas aerotolerantes (Drake *et al.*, 2002).

En la tabla 4 se muestra algunas bacterias acetogénicas y las reacciones que llevan a cabo.

Tabla 4. Bacterias acetogénicas sintróficas obligatorias de la digestión anaerobia (García, 1991)

Bacterias	Reacción
Organismos "S" (<i>Pelobacter sp.</i>)	$Etanol + H_2O \rightarrow acetato + H_2O$
<i>Syntrophobacter wolinii</i>	$Propionato + 3 H_2O \rightarrow acetato + 3 H_2O + CO_2$
<i>Syntrophomonas bryantii</i> <i>sapovorans</i> <i>wolfei sub. sp.</i> <i>saponavida</i> <i>wolfei sub. sp. Wolfei</i>	$Butirato + 2 H_2O \rightarrow 2 acetato + 2 H_2O$
<i>Syntrophospora bryantii</i>	
<i>Syntrophus buswellii</i>	$Benzoato + 7 H_2O \rightarrow 3 acetato + 3 H_2O + CO_2$

La taxonomía de algunas bacterias representantes acidogénicas/acetogénicas, es:

- Phylum *Proteobacteria*
 Clase *δ-Proteobacteria*
 Orden *Desulfuromonales*
 Familia *Desulfuromonaceae*
 Género *Pelobacter*
 Orden *Syntrophobacterales*
 Familia *Syntrophobacteraceae*
 Género *Syntrophobacter*
 Familia *Syntrophaceae*
 Género *Syntrophus*
- Phylum *Firmicutes*
 Clase *Clostridia*
 Orden *Clostridiales*
 Familia *Clostridiaceae*
 Género *Clostridium*
 Género *Acetivibrio*
 Familia *Lachnospiraceae*
 Género *Butyrivibrio*
 Género *Ruminococcus*
 Familia *Eubacteriaceae*
 Género *Eubacterium*
 Género *Acetobacterium*
 Familia *Acidaminococcaceae*
 Género *Veillonella*

	Familia	<i>Syntrophomonadaceae</i>
	Género	<i>Syntrophomonas</i>
	Género	<i>Syntrophospora</i>
Clase	<i>Bacilli</i>	
Orden	<i>Bacillales</i>	
	Familia	<i>Bacillaceae</i>
	Género	<i>Bacillus</i>
	Familia	<i>Staphylococcaceae</i>
	Género	<i>Staphylococcus</i>
Orden	<i>Lactobacillales</i>	
	Familia	<i>Lactobacillaceae</i>
	Género	<i>Lactobacillus</i>
	Familia	<i>Streptococcaceae</i>
	Género	<i>Streptococcus</i>
Phylum	<i>Actinobacteria</i>	
Clase	<i>Actinobacteria</i>	
Subclase	<i>Actinobacteridae</i>	
Orden	<i>Actinomycetales</i>	
	Suborden	<i>Micrococcinae</i>
	Familia	<i>Micrococcaceae</i>
	Género	<i>Micrococcus</i>
	Suborden	<i>Propionibacterineae</i>
	Familia	<i>Propionibacteriaceae</i>
	Género	<i>Propionibacterium</i>
Orden	<i>Bifidobacteriales</i>	
	Familia	<i>Bifidobacteriaceae</i>
	Género	<i>Bifidobacterium</i>

1.5.6 Organismos metanotróficos

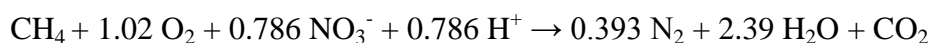
Las bacterias oxidantes de metano (metanótrofos) son bacterias metilotróficas que utilizan el metano y compuestos pequeños de carbono como fuente de energía (Murrell, 1994; Hanson y Hanson, 1996). Tras el análisis de 16S rRNA se definió las relaciones filogenéticas y ocho géneros de organismos metanotrofos: *Methylococcus*, *Methylomonas*, *Methylomicrobium*, *Methylobacter*, *Methylocaldum*, *Methylosphaera*, *Methylocystis* y *Methylosinus*.

Los organismos metanotrofos se dividen en dos distintos grupos filogenéticos: Tipo I y Tipo II (Eller *et al.*, 2001).

El Tipo I (*Methylomonas*, *Methylomicrobium*, *Methylobacter*, *Methylocaldum*, *Methylosphaera*) es capaz de asimilar el formaldehído producido a partir de la oxidación del metano (vía del metanol), mientras que el Tipo II (*Methylocystis* y *Methylosinus*), utiliza el grupo de la serina para la asimilación del formaldehído (Hanson y Hanson, 1996; Bourne *et al.*, 2000). Los miembros del género *Methylococcus* poseen una combinación de características tanto del Tipo I como del Tipo II metanotrofos.

El Tipo I (incluyendo *Methylococcus*) se encuentra en la subdivisión de γ -*Proteobacteria*, mientras que el grupo II se encuentra en la subdivisión α -*Proteobacteria* (Tsien *et al.*, 1990; Brusseau *et al.* 1994; Bourne *et al.*, 2000).

Las bacterias metanotrofas también juegan un papel en el ciclo del nitrógeno, una de las reacciones que pueden llevar a cabo es (Modin *et al.*, 2007):



La taxonomía de los distintos géneros de las bacterias metanotróficas según en el manual Bergey (Garrity, *et al.*, 2001) son:

Phylum	<i>Proteobacteria</i>
Clase	α - <i>Proteobacteria</i>
Orden	<i>Rhizobiales</i>
Familia	<i>Methylocystaceae</i>
Género	<i>Methylocystis</i>
Género	<i>Methylosinus</i>
Clase	γ - <i>Proteobacteria</i>
Orden	<i>Methylococcales</i>
Familia	<i>Methylococcaceae</i>
Género	<i>Methylococcus</i>
Género	<i>Methylobacter</i>
Género	<i>Methylocaldum</i>
Género	<i>Methylomicrobium</i>
Género	<i>Methylomonas</i>
Género	<i>Methylosphaera</i>

1.5.7 Bacterias Sulfato Reductoras (SRB)

Las SRB participan en el ciclo del sulfuro y en una variedad de procesos esenciales como: descomposición de materia orgánica, biodegradación de

contaminantes cloro-aromáticos, metilación del mercurio (Fauque, 1995; Barton, 1995) y remediación ambiental en diversos ambientes. Los análisis 16S rRNA han dado a conocer que las SRB están dentro de 6 linajes filogenéticos diferentes, 4 dentro del dominio bacteria y 2 dentro del dominio arquea (Muyzer *et al.*, 2008). La mayoría de las SRB están dentro de la subclase δ -*Proteobacteria* (~ 23 géneros). Igualmente encontramos algunos géneros entre las *Clostridia* (*Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus*, *Desulfosporomusa* y *Thermodesulfobium*), *Nitrospira* (*Thermodesulfovibrio*), *Thermodesulfobacteria* (*Thermodesulfobacterium*). Por último, dentro del dominio arquea encontramos *Archaeoglobus*, *Thermocodium* y *Calditerrivita* (Muyzer *et al.*, 2008).

Los sustratos a partir de los cuáles las bacterias sulfato reductoras obtienen energía directamente van desde el hidrógeno hasta compuestos aromáticos, aunque la mayoría utiliza sustratos tales como acetato, lactato, piruvato y etanol, que son compuestos comunes en los ecosistemas (Pallud y Van Cappellen, 2006).

Las bacterias sulfato-reductoras que se conocen están divididas entre oxidadores completos y en oxidadores incompletos. La familia *Desulfobacteraceae* pertenece a los oxidadores completos. Estos organismos pueden vivir en ambientes extremos halófilos. Lo que indica que existen SRB halofílicas tolerantes a las sales, las cuales posiblemente poseen nuevas vías metabólicas, siendo capaces de degradar anaeróbicamente compuestos complejos tales como la celulosa (Foti *et al.*, 2007). Entre los oxidadores incompletos están a las *Desulfovibrionales* y la familia *Desulfobulbeaceae*.

Las SRB también son importantes miembros de la comunidad microbiana involucrada en la reducción de metales que se lleva a cabo en una variedad de ambientes incluyendo plantas productoras de aceites y gas, aguas de desecho de origen doméstico, industrial y de minas (Singleton, 1993).

Los organismos sulfato reductores utilizan el sulfato como un aceptor terminal de electrones, pero la mayoría de las SRB también son capaces de crecer sobre una amplia variedad de aceptores de electrones, tales como tiosulfato, sulfito, azufre elemental y nitrato (Bak *et al.*, 1991; Madigan *et al.*, 2004). Entre los dadores de electrones simples se encuentran desde etanol, lactato e hidrógeno hasta compuestos más complejos como los hidrocarburos (Jorgensen, 1982; Rabus *et al.*, 1996; Krekeler *et al.*, 1998; Krumholz *et al.*, 1999; Steger *et al.*, 2002; Kaksonen *et al.*, 2004; Madigan *et al.*, 2004).

También se sabe que muchas cepas SRB pueden fijar N₂ y usar el nitrógeno de los aminoácidos como fuente de nitrógeno. Algunas *Desulfovibrio* son capaces de

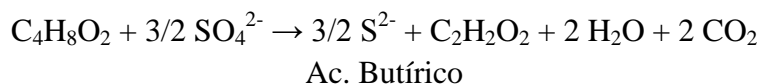
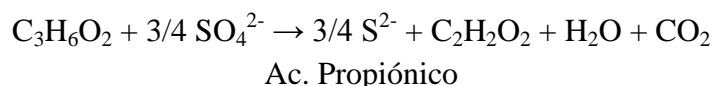
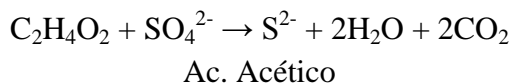
utilizar nitrato como aceptor final de electrones y otras reducen el nitrato a amonio (Lie *et al.*, 1999).

Adicionalmente las SRB pueden tolerar una variedad de metales pesados y sulfuro disuelto, Algunos de estos organismos son capaces de reducir Fe^{+3} a magnetita (Fe_3O_4) o siderita (FeCO_2) y U^{+4} a uranito (UO_2), aunque no generen energía a partir de estos procesos (Lovley *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 2001).

Las SRB utilizan principalmente compuestos de bajo peso molecular y a la mayoría de estos son conocidos como productos fermentativos de la degradación bacteriana de carbohidratos, proteínas y otros compuestos. Unas pocas SRB son capaces de degradar complejos moleculares como compuestos aromáticos (Widdel, 1988).

Los dadores de electrones más importantes son H_2 , acetato, lactato, butirato y propionato (Sorensen *et al.*, 1981; Postgate, 1984; Hao *et al.*, 1996; Fukui *et al.*, 1999).

Algunas de las reacciones más importantes que llevan a cabo las bacterias sulfato-reductoras (Ruel *et al.* 2002) son:



La clasificación por rRNA de varias especies de SRB, es (Castro *et al.*, 2000):

SRB gram-negativas mesófilas.- *Desulfobulbus*, *Desulfomicrobium*, *Desulfomonas*, *Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfococcus*, *Desulfomonile*, *Desulfonema*, *Desulfosarcina*.

SRB gram-positivas formadoras de esporas.- *Desulfotomaculum*

SRB termófilas.- *Thermodesulfobacterium*

SRB arqueas termófilas.- *Archaeoglobus*

Todos estos grupos se caracterizan por que utilizan el sulfato como aceptor de electrones durante la respiración anaerobia con la consecuente producción de sulfuro de hidrógeno (H_2S).

Daly *et al.*, 2000, clasificaron a las SRB más conocidas y representativas, restringiéndose a géneros mesofílicos dentro de la subdivisión δ -*Proteobacteria* y gram (-/+), agrupándolos en seis grupos filogenéticos distintos:

Grupo 1. *Desulfotomaculum* (DFM).

Grupo 2. *Desulfobulbus* (DBB).

Grupo 3. *Desulfobacterium* (DBM).

Grupo 4. *Desulfobacter* (DSB).

Grupo 5. *Desulfococcus*, *Desulfonema*, *Desulfosarcina* (DCC).

Grupo 6. *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium* (DSV).

Grupo 1. *Desulfotomaculum* (DFM): son organismos con morfología de bacilos, rectos o curvados, móviles, con pared celular, mesófilos, Gram positivas de bajo contenido GC (contenido de guanina y citocina), no contienen desulfovirdina, forman esporas volviéndose de este modo resistentes a condiciones adversas (deseccación y oxidación del medio ambiente) que permite subsistir en una gran variedad de medios (Londry *et al.*, 1997; Castro *et al.*, 2000). Son capaces de utilizar hidrógeno como fuente de energía, lo que les otorga un carácter quimiolitótrofo (Imachi *et al.*, 2000). Este género tiene además la capacidad de realizar la dismutación de tiosulfato (Jackson *et al.*, 2000).

Grupo 2. *Desulfobulbus* (DBB): Este grupo presenta tres especies: *Desulfobulbus elongatus*, *Desulfobulbus Marinus* y *Desulfobulbus propionicus*. Se caracterizan por ser células ovoides, no forman esporas, no contienen desulfovirdina, presentan un flagelo polar único, algunas especies presentan motilidad y otras no. A diferencia del grupo 1 *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus* es mesófila Gram negativa al igual que los demás grupos de SRB (Balows *et al.*, 1992), por lo que se desarrollan entre 20 y 40 °C. Utilizan propionato como donador de electrones oxidándolo de manera incompleta hasta acetato, además son capaces de subsistir con lactato, etanol, H₂, acetato, formato y bicarbonato (Benoit *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2002), utilizando alguno de estos compuestos incluso en ausencia de sulfato (Balows *et al.*, 1992). También se ha visto que este grupo puede utilizar nitrato (Ito *et al.*, 2002) como aceptor final de electrones por lo que es capaz de competir con las bacterias desnitrificantes. Además, utilizan oxígeno adquiriendo un carácter aerotolerante y probablemente facultativo (Ito *et al.*, 2002). En ambientes oxigenados se producen etapas de latencia, con una composición de SRB predominante de los géneros *Desulfobulbus* y *Desulfovibrio*, ambos géneros presentan la capacidad de adaptarse a la química de su entorno (Santegoeds *et al.*, 1999).

Este grupo puede realizar la dismutación de azufre, sulfuro, sulfito y tiosulfato (Finster *et al.*, 1998), con azufre elemental como compuesto intermediario. Por otra

parte se ha reportado que *Desulfobulbus propionicus* realiza la metilación del mercurio en cultivos puros (Widdel y Bak 1992; Benoit *et al.*, 2001).

Grupo 3. *Desulfobacterium* (DBM): este es un grupo nutricionalmente versátil, con formas semejantes a bastoncillos de forma oval o casi esférica. Presenta capacidades especiales en cuanto a degradación de compuestos orgánicos, como la descomposición de hidrocarburos. Las especies de este género son fundamentalmente marinas y requieren elevadas concentraciones de cloruro de sodio. Al igual que *Desulfobacter*, *Desulfobacterium* es potencialmente importante para la metilación del mercurio y no tolera condiciones aerobias (Widdel y Bak, 1991; King *et al.*, 2000).

Grupo 4. *Desulfobacter* (DSB): una de las características más sobresalientes de este grupo es su capacidad de oxidar de manera completa y efectiva al acetato debido a que poseen toda la maquinaria funcional para realizar el ciclo del ácido cítrico (Balows *et al.*, 1992). Además se ha visto la versatilidad de este grupo para utilizar gran variedad de substratos. Son bacterias ovoides o semiesféricas parecidas a las *Desulfovibrio*, normalmente motiles y se desplazan mediante un flagelo polar único, mesófilas, no producen esporas y no tienen desulfovirdina. Además se ha identificado al género *Desulfobacter* con uno de los principales metiladores de mercurio en medios que contienen lactato y acetato (Widdel y Bak 1992; King *et al.*, 2000).

Grupo 5. *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina* (DCC): los tres géneros de este grupo son estructuralmente diferentes. *Desulfococcus* y *Desulfosarcina* se agrupa en células coloides virtualmente inmóviles y *Desulfonema* es el único género de SRB multicelular filamentosa motil por deslizamiento. Morfológicamente presentan formas de bastoncillos ovalados. La característica metabólica de este grupo implica oxidación completa de substratos (Castro *et al.*, 2000) tales como formato, acetato, acetona, propionato, butirato, isobutirato, valerato, metilbutirato, caproato, malato, piruvato, succinato, fumarato, malato benzoato, etanol, propanol, butanos, hidrógeno y CO₂ (Fukui *et al.*, 1999).

Este grupo ha sido detectado en la quimioclina, entre ambientes aerobio y anaerobio, por lo que podría tener la capacidad de tolerar el oxígeno (Widdel y Bak, 1992). *Desulfococcus* es uno de los géneros más importantes en cuanto a la metilación del mercurio, tercero después de *Desulfomicrobium* y *Desulfobacter* (Widdel y Bak, 1992; King *et al.* 2000).

Grupo 6. *Desulfovibrio-Desulfomicrobium*: la familia *Desulfovibrionaceae* incluye a los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfomicrobium*, aunque otros dos géneros podrían ser incorporados dentro de la misma (*Desulfohalobium* y *Desulfonatronum*).

Desulfovibrio son en general vidrioides, espiralados u ovoides, no forman esporas contienen desulfovirdina y son motiles (Castro *et al.*, 2000). Una de sus características más importantes es su capacidad para tolerar oxígeno y en algunos casos, incluso consumirlo (Zinkevich y Beech 2000; Loubinoux *et al.*, 2002; Fournier *et al.*, 2006) ya que son capaces de subsistir bajo estrés oxidante (Schoenborn *et al.* 2001).

El género *Desulfomicrobium*, en cuanto a sus características fisiológicas y nutricionales es muy similar a *Desulfovibrio*, tiene forma de bastoncillo y carece de desulfovirdina.

Este grupo metabólicamente se diferencia de la familia *Desulfobacteriaceae* por realizar la oxidación incompleta de los sustratos con la formación final de acetato durante la fermentación (Voordouw *et al.*, 1995). La característica más sobresaliente es su capacidad de adaptarse a diversos hábitats gracias a sus intrincadas estrategias metabólicas que les permite subsistir.

La taxonomía de algunas sulfato reductoras queda de la siguiente manera (Garrity *et al.*, 2004):

Dominio Arquea

Phylum *Crenarchaeota*
Clase *Thermoprotei*
Orden *Thermoproteales*
Familia *Thermoproteaceae*
Género *Caldivirga*
Género *Thermocladium.*

Phylum *Euryarchaeota*
Clase *Archaeoglobi*
Orden *Archaeoglobales*
Familia *Archaeoglobaceae*
Género *Archaeoglobus*

Dominio Bacteria

Phylum *Thermodesulfobacteria*
Clase *Thermodesulfobacteria*
Orden *Thermodesulfobacteriales*
Familia *Thermodesulfobacteriaceae*
Género *Thermodesulfobacterium*

Phylum *Nitrospira*
Clase *Nitrospira*
Orden *Nitrospirales*

	Familia	<i>Nitrospiraceae</i>
	Género	<i>Thermodesulfovibrio</i>
Phylum		<i>Proteobacteria</i>
Clase		<i>δ-Proteobacteria</i>
Orden		<i>Desulfovibrionales</i>
	Familia	<i>Desulfovibrionaceae</i>
	Género	<i>Desulfovibrior</i>
	Familia	<i>Desulfomicrobiaceae</i>
	Género	<i>Desulfomicrobium</i>
	Familia	<i>Desulfohalobiaceae</i>
	Género	<i>Deulfohalobium</i>
	Género	<i>Desulfomonas</i>
	Género	<i>Desulfonatronovibrio</i>
	Familia	<i>Desulfonatronomaceae</i>
	Género	<i>Desulfonatronum</i>
Orden		<i>Desulfobacterales</i>
	Familia	<i>Desulfobacteraceae</i>
	Género	<i>Desulfobacter</i>
	Género	<i>Desulfobacterium</i>
	Género	<i>Desulfobacula</i>
	Género	<i>Desulfococcus</i>
	Género	<i>Desulfofaba</i>
	Género	<i>Desulfofrigus</i>
	Género	<i>Desulfonema</i>
	Género	<i>Desulfosarcina</i>
	Familia	<i>Desulfobulbaceae</i>
	Género	<i>Delsulfobulbus</i>
	Género	<i>Desulfocapsa</i>
	Género	<i>Desulfofustis</i>
	Género	<i>Desulforhopalus</i>
Orden		<i>Desulfuromonales</i>
	Familia	<i>Desulforomonaceae</i>
	Género	<i>Desulfomonas</i>
Orden		<i>Syntrophobacterales</i>
	Familia	<i>Syntrophobacteraceae</i>
	Género	<i>Syntrophobacter</i>
	Familia	<i>Syntrophaceae</i>
	Género	<i>Desulfomonile</i>
Phylum		<i>Firmicutes</i>
Clase		<i>Clostridia</i>
Orden		<i>Clostridiales</i>
	Familia	<i>Peptococcaceae</i>

	Género	<i>Desulfosporosinus</i>
	Género	<i>Desulfotomaculum</i>
Orden		<i>Thermoanaerobacterales</i>
	Familia	<i>Thermodesulfobiaceae</i>
	Género	<i>Thermodesulfobium</i>
Clase		* <i>Negativicutes</i>
Orden		* <i>Selenomonadales</i>
	Familia	* <i>Veillonellaceae</i>
	Género	* <i>Desulfosporomusa</i>
		* <i>Sass et al., 2004</i>

1.6 Dominio eucariota

En el tratamiento de las aguas residuales también encontramos organismos eucariotas como son los protozoos, hongos, algas y Metazoos (rotíferos y nematodos).

Los protozoos son organismos heterótrofos, la mayoría de ellos son aerobios o anaerobios facultativos aunque se han encontrado algunos organismos anaerobios estrictos. Pueden alimentarse de bacterias u otros microorganismos, pero también de materia orgánica disuelta, aunque no se cree que compitan eficientemente con las bacterias (Ferrer *et al.*, 2007).

Los protozoos constituyen aproximadamente el 5% de la biomasa de los fangos activos (Ferrer *et al.*, 2007). Básicamente tienen dos funciones; la primera es actuar eliminando el exceso de bacterias no floculadas, es decir, consumen bacterias que son libres o no formadoras de flóculos (bacterias dispersas). La segunda función es que desempeñan el papel de buen indicador directo de toxicidad, ya que estos organismos son más sensibles a los tóxicos y a los cambios de oxígeno. Esta es la razón de utilizarlos como indicadores del funcionamiento (indicadores bióticos) de las EDAR. Los grupos básicos que pueden observarse en los fangos activos son: Flagelados, Amebas, Ciliados nadadores libres y Ciliados pedunculados (Vilaseca, 2001).

La mayoría de los hongos son aerobios estrictos, toleran pH relativamente bajos y tienen requisitos de nitrógeno más bajos que las bacterias. También pueden utilizar materia orgánica disuelta aunque rara vez compiten con las bacterias en los sistemas de cultivo en suspensión como los fangos activos.

Los Metazoos tienen menos presencia que los protozoos. La mayoría de este grupo que podemos encontrarlos en los fangos activos son los rotíferos y nematodos. Suelen alimentarse de protozoos y bacterias ayudando a la clarificación del efluente (Vilaseca, 2001).

1.7 Importancia de identificar los microorganismos en los tratamientos de las aguas

Los fangos activos consisten en el desarrollo de un cultivo microbiológico capaz de degradar la materia orgánica presente en las aguas residuales a tratar, por lo que la estabilidad de esta población depende de las condiciones ambientales y operacionales.

La abundancia, diversidad y estructura de la comunidad microbiana son indicadores muy valiosos para el proceso y para la evaluación del grado de depuración y calidad del efluente (GBS, 2008). La eficiencia de una EDAR depende principalmente de la composición y actividad de la comunidad microbiana y varía dependiendo de las características a tratar (Wagner *et al.*, 2002).

Muchos esfuerzos se enfocan en establecer vínculos entre la estructura de la comunidad microbiana y las funciones de los grupos que integran tal comunidad con el diseño y la operación de la EDAR. En la actualidad el uso de herramientas moleculares para el estudio de las comunidades microbianas ha mejorado los estudios microbiológicos haciéndolos más confiables y eficientes.

Conocer y entender la comunidad microbiana en las distintas etapas del tratamiento de las aguas residuales, así como los cambios que hay dentro de la comunidad microbiana a causa de las variaciones operacionales y relacionar estos cambios con la calidad del efluente, podría contribuir al desarrollo de sistemas más estables, eficientes, rápidos y menos costosos que los ya existentes.

Por otro lado, las exigencias ambientales de la sociedad se recogen en una legislación cada vez más estricta. Esto hace que se requiera cambios operacionales en los tratamientos para cumplir con tales exigencias o en su caso mejorar las deficiencias en los tratamientos establecidos. El conocer la comunidad microbiana ayuda a que los cambios operacionales sean rápidos y precisos para cumplir de manera adecuada las exigencias de la legislación.

Yuan (Yuan *et al.*, 2002) postula que conocer la estructura y propiedades de las comunidades microbianas es fundamental y que es importante establecer una cooperación entre los ingenieros y los microbiólogos. Esto generaría avances más rápidos y confiables para la incorporación de datos en los modelos matemáticos enfocados a la optimización de los procesos de fangos activos.

1.8 Técnicas moleculares para la determinación de las poblaciones microbianas. Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

En la actualidad se hace uso de técnicas de biología molecular que permiten estudiar la diversidad taxonómica y la estructura de las comunidades microbianas, ya que brindan la posibilidad de identificar poblaciones microbianas específicas en su hábitat natural (sin necesidad de cultivarlas) generando resultados confiables y rápidos (Cárdenas *et al.*, 2006).

En la ecología microbiana se hace uso de herramientas tales como las técnicas moleculares DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), T-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism), SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) y PCR (Polymerase Chain Reaction). A continuación se describen brevemente estas técnicas:

- DGGE (Muyzer *et al.*, 1993). Junto con las técnicas SSCP y T-RFLP son el análisis fragmentario más utilizado para el estudio microbiológico de las aguas residuales. Este procedimiento se basa en la separación de fragmentos de 16S rDNA obtenidos con la técnica PCR (figura 24), mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Estos geles contienen un gradiente desnaturante químico, de tal manera que los fragmentos de DNA de la misma longitud pero con diferente secuencia de nucleótidos quedan separados.

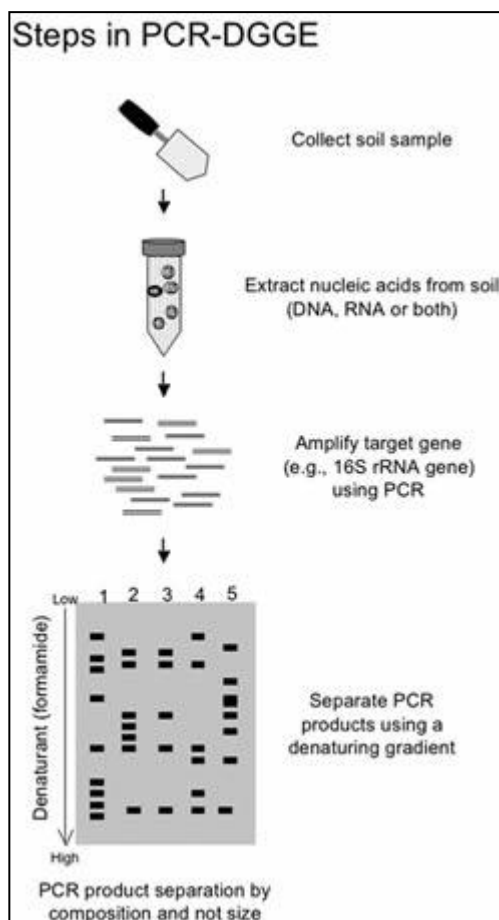


Figura 24. Diagrama de la técnica DGGE (Geona *et al.*, 2012).

- T-RFLP (Liu *et al.*, 1997). Esta técnica se basa en la separación de los fragmentos de 16S rDNA según su tamaño. Dichos fragmentos son generados después del tratamiento con enzimas de restricción del DNA extraído y amplificado mediante PCR (figura 25). De esta forma se obtiene un patrón de picos, cada uno de los cuales corresponde teóricamente a una secuencia de 16S rDNA y por extensión a una población microbiana.

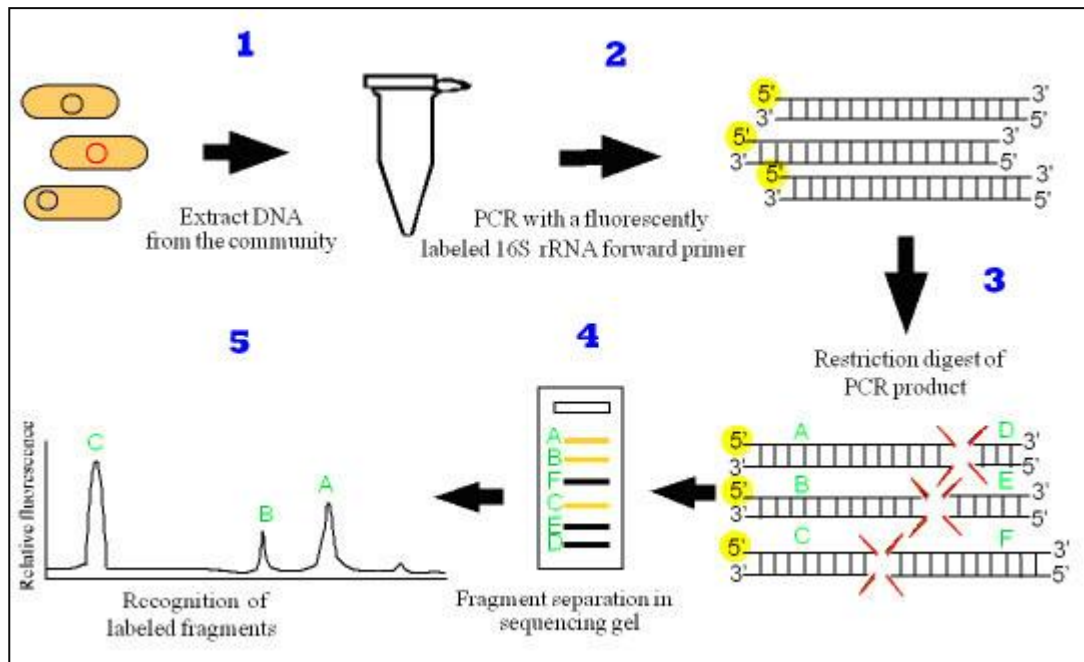


Figura 25. Diagrama de la técnica T-RFLP (Stres, 2006).

- SSCP (Schwieger y Tebbe, 1998). Esta técnica de electroforesis se basa en la separación de fragmentos de DNA de cada cadena simple según su estructura secundaria. En condiciones normales el DNA de cadena simple se repliega sobre si mismo adquiriendo estructura secundaria según la secuencia primaria de nucleótidos que posea y las condiciones del medio en el que se encuentre. De este modo las estructuras replegadas se pueden separar por electroforesis en un gel de poliacrilamida debido a la diferencia de movilidad que poseen dichas cadenas (figura 26).

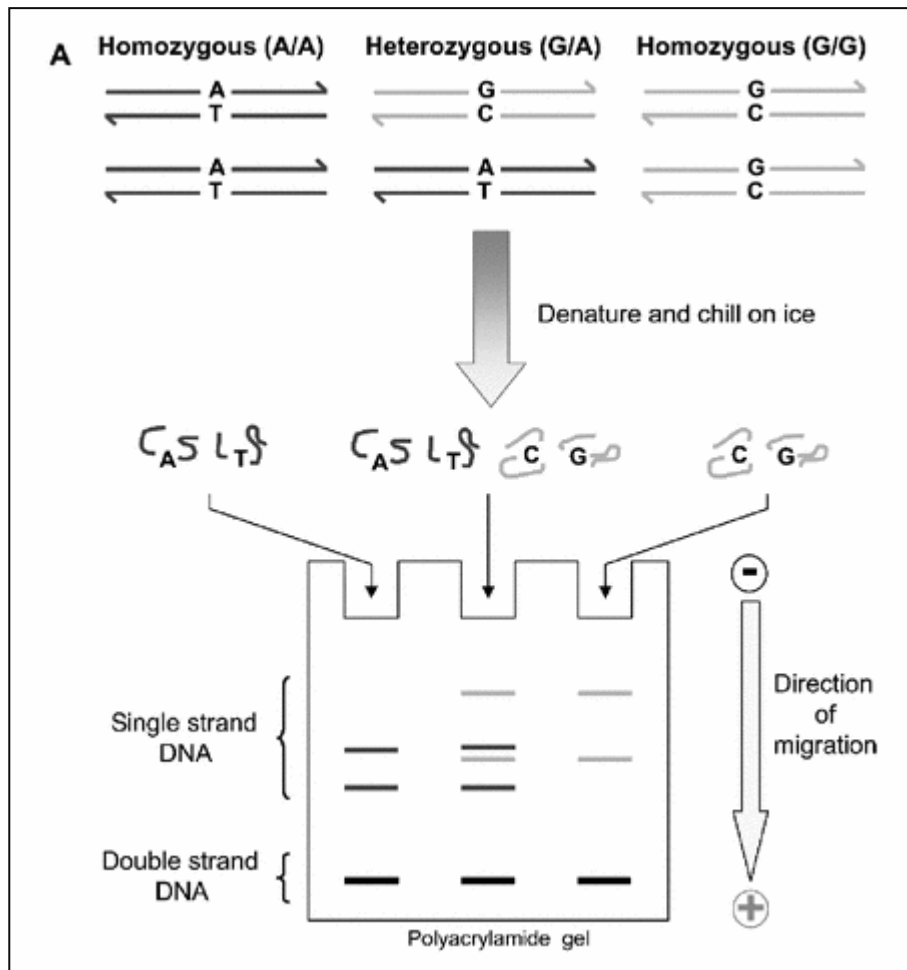


Figura 26. Diagrama de la técnica SSCP (Leung *et al.*, 2008).

- PCR (Liesack y Dunfield, 2002). Esta técnica consiste en obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA particular. Esta técnica sirve para ampliar un fragmento de DNA. El proceso consiste en una serie de 20 a 35 ciclos (figura 27), cada ciclo consiste en 2-3 pasos donde hay alternancia de temperatura. Los tiempos y temperaturas aplicadas dependen de una variedad de parámetros. Estos incluyen enzimas usadas para la síntesis de DNA, la concentración de iones divalentes y de los dNTP (desoxirribonucleótidos trifosfato) en la reacción y la temperatura de unión de los cebadores así como la longitud de DNA que se desea amplificar.

La hibridación molecular es una de las técnicas que permite la detección del rRNA 16S empleando sondas marcadas con fluorocromos.

Las células de muchos microorganismos son ricas en RNA. En las bacterias y arqueas los ribosomas son de tamaño 70S (S indica las unidades de masa Svedberg), formadas por dos subunidades, una de 50S y otra de 30S, cada uno contiene varias

proteínas y rRNA. En las bacterias constituye el 20-25 % del peso seco. El RNA predominante es el ribosómico (rRNA) que se presenta en varias especies moleculares (23S, 16S y 5S) y que constituye el 80% del RNA total (Parés *et al.*, 1997). La presencia del 16S rRNA en grandes cantidades en procariontas (Amann *et al.*, 1995) permite diseñar sondas específicas para la secuencia 16S rRNA permitiendo el procesamiento de un gran número de muestras requeridas para el estudio ecológico, al mismo tiempo que posibilita la detección directa de microorganismos concretos en las muestras (Salazar, 2008).

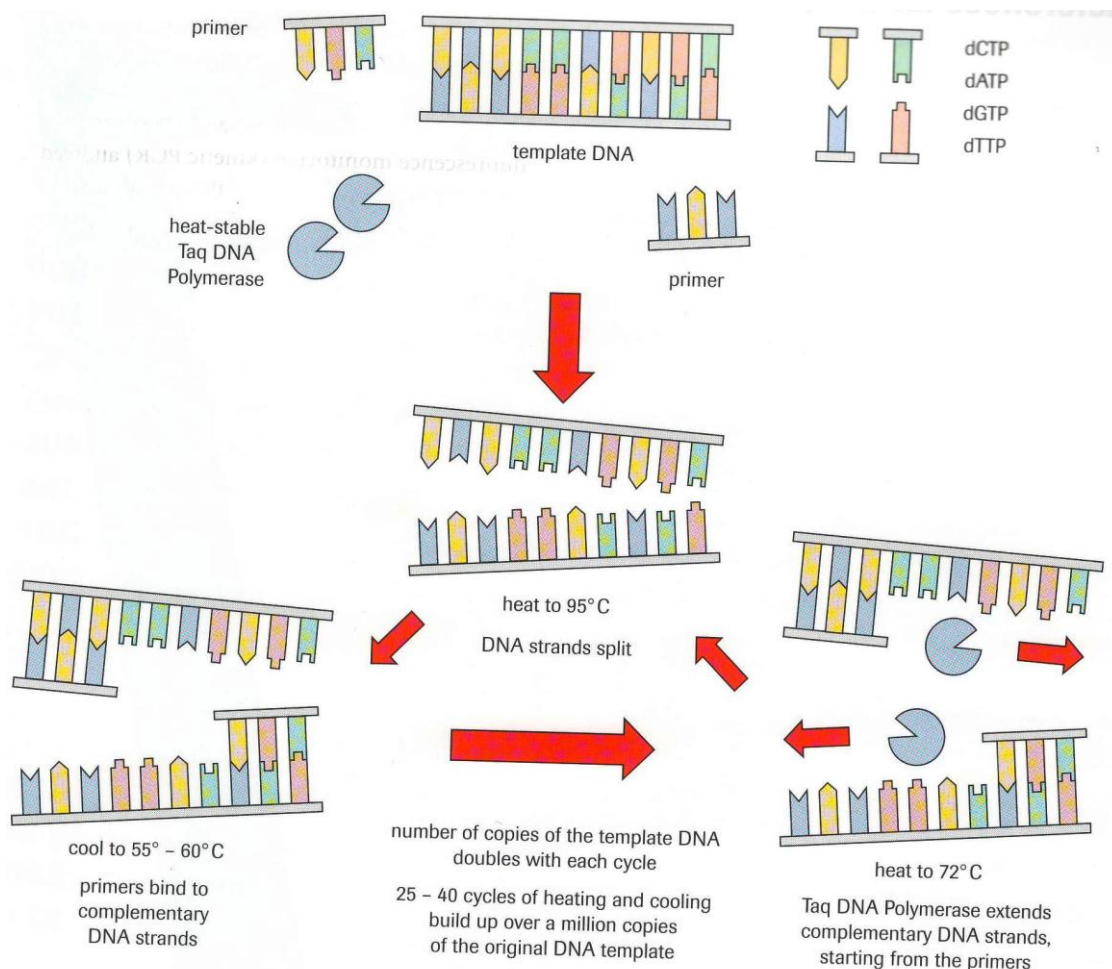


Figura 27. Diagrama de la técnica PCR (Steffen *et al.*, 1999).

La hibridación permite mejorar las estimaciones de la abundancia microbiana, mostrando una estratificación de los diferentes grupos filogenéticos de las comunidades microbianas (Devereux *et al.*, 1992; Ramsing *et al.*, 1996).

La hibridación molecular fluorescente *in situ* (FISH) consiste en la detección de una secuencia de nucleótidos dentro del genoma. Esta técnica utiliza fragmentos de DNA (sondas) marcadas con fluorocromos, basándose en la hibridación específica de dos secuencias de ácidos nucleicos complementarios entre la sonda marcada y la bacteria diana, formando un híbrido DNA: RNA fácilmente detectable mediante un microscopio de fluorescencia (Cárdenas *et al.*, 2006). La hibridación del 16S rRNA genera una valiosa información acerca de la caracterización y abundancia de comunidades microbianas y en algunos casos acerca de la actividad bacteriana.

La fluorescencia se produce mediante el uso de fluorocromos que son sustancias que tienen la propiedad de absorber energía de una longitud de onda específica y volverla a emitir con una determinada longitud de onda mayor (menor energía). La cantidad de energía emitida y su longitud de onda depende del propio fluorocromo.

La Técnica FISH es ampliamente utilizada en prácticamente todos los campos de la microbiología, encontrándose muy desarrollada en el campo medio ambiental. Esta técnica presenta una serie de ventajas frente a otros métodos moleculares (García *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2009):

- Localización de las bacterias. FISH permite la localización espacial *in situ* de las bacterias dentro de una muestra de fangos. De esta forma se puede obtener información de cómo se distribuyen los diferentes grupos bacterianos dentro de una biopelícula o flóculos dentro del reactor.
- Independencia de los métodos de cultivo y aislamiento. Para llevar a cabo la aplicación de la técnica FISH no es necesario realizar ningún tipo de cultivo ni aislamiento de las bacterias que se requiera estudiar.
- Estabilidad. Los oligonucleótidos son muy estables, ya que se pueden almacenar en una solución que contenga una determinada concentración de sondas a -20°C durante muchos meses o años, sin que se produzca su degradación. Asimismo, no son degradados por enzimas RNAsas, por lo que las muestras fijadas no tienen que estar libres de este tipo de enzimas.
- Disponibilidad. Una vez que se conoce la secuencia de la sonda que se necesita se puede obtener de forma comercial. El grado de pureza de la sonda es muy alto.
- Rapidez y bajo coste. La hibridación mediante el uso de oligonucleótidos puede llevarse a cabo en un día, salvo excepciones. Por otra parte, el coste no es muy elevado debido al limitado requerimiento tanto de material como de reactivos químicos, ya que no se necesita realizar purificaciones ni síntesis de ningún tipo una vez adquirida la sonda.

- Alta especificidad. Existen regiones en el rRNA muy conservadas y otras muy variables. Estas dos regiones se usan para el diseño de las sondas, de tal manera que puede utilizarse esta técnica para detectar especies muy próximas filogenéticamente o grandes grupos de microorganismos.
- Buen grado de penetración en los organismos. Debido al pequeño tamaño de las sondas, su penetración a través de la membrana de los microorganismos es muy eficiente.
- Buena reproducibilidad. Bajo las mismas condiciones de experimentación esta técnica posee un alto grado de reproducibilidad.

Sin embargo la técnica presenta también algunas desventajas (García *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2009):

- Conocimiento de la secuencia de rRNA. Este punto es muy importante en el momento del diseño de la sonda. Sin embargo existen bases de datos donde se puede hallar la información acerca de la secuencia del rRNA.
- Mala penetración de la sonda en la célula. Esto puede suceder en algunas muestras donde se hallan células Gram positivas y que poseen membranas con gran cantidad de ácidos micólicos y cuya pared celular es difícil de penetrar. A estas muestras se les somete a tiempos de fijación e hibridación más altos y a reactivos que son capaces de permeabilizar la membrana celular.
- Contenido ribosomal de la célula. El éxito de la hibridación depende del contenido de ribosomas, es decir, si las muestras presentan bajo contenido de ribosomas no se visualizará señal de hibridación o una señal muy baja.

En la figura 28, se muestra el fundamento de la técnica de hibridación FISH.

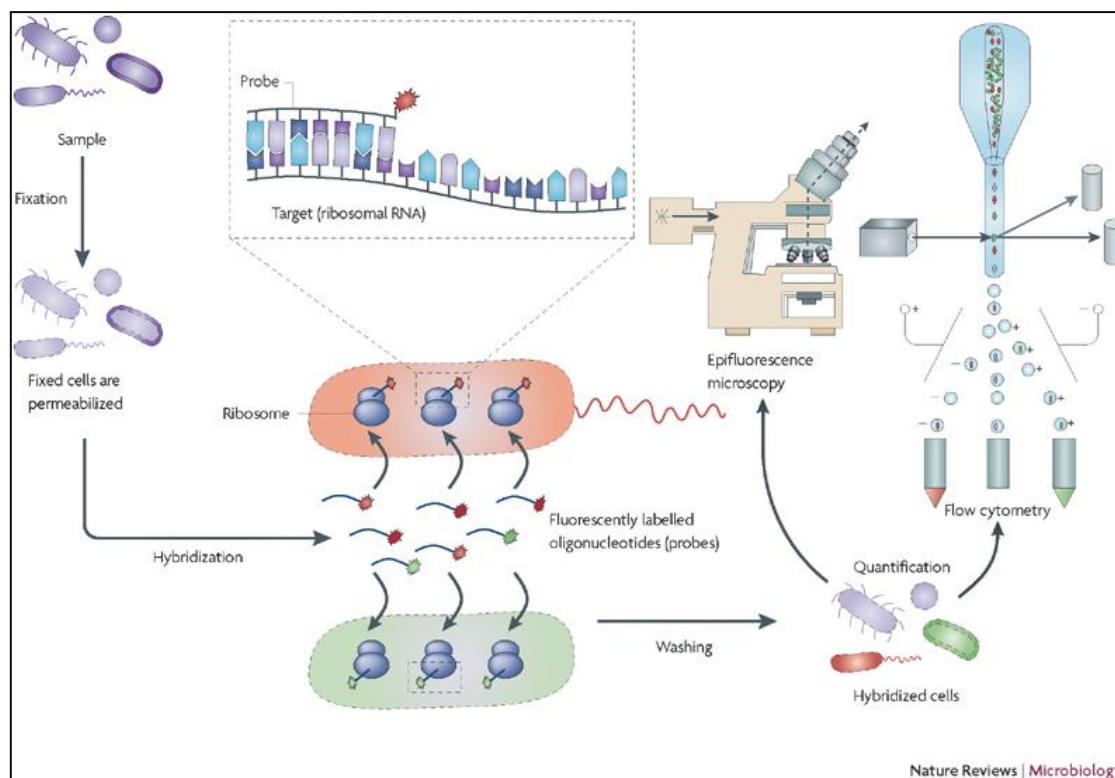


Figura 28. Esquema de la hibridación fluorescente in situ FISH (Amann *et al.*, 2008).

Se han desarrollado diversos estudios para conocer la estructura y diversidad de las comunidades microbianas, sin embargo falta mucho camino que recorrer en este tema. En la figura 29, se observa los resultados de la identificación de la comunidad bacteriana mediante la técnica FISH en muestras de diferentes EDAR, reportados en el libro *Microbial ecology of activated sludge* (Seviour y Nielsen, 2010).

Plant name	Plant configuration	Population composition (biovolume % against Eubmix)											Reference
		Proteobacteria			Acetivibrio	Firmicutes	Bacteroidetes	'Chloroflexi'	Planctomycetales	Acetivibrio	Nitrospira		
		Alpha	Beta	Gamma	(HGC689)	(LGCmix)	(CF319a+b)	(CFX1223)	(Eub3381)	(HOAc1402)	(Ntspa1026.662.712)		
Dietersheim	Unspecified	16 ± 2	51 ± 7	11 ± 4	22 ± 6	13 ± 5	6 ± 1	ND	< 1	ND	ND		Schmid <i>et al.</i> (2003a)
GroBlappen	Unspecified	13 ± 3	24 ± 3	4 ± 1	21 ± 16	7 ± 4	6 ± 2	ND	4 ± 1	ND	ND		Schmid <i>et al.</i> (2003a)
Poing	Unspecified	9 ± 2	18 ± 3	7 ± 1	36 ± 9	25 ± 5	1 ± 0	ND	2 ± 1	ND	ND		Schmid <i>et al.</i> (2003a)
Ariake_A2O	A2O	9	20	9	10	< 1	< 1	ND	ND	ND	ND		Wong <i>et al.</i> (2005)
Nakano	AO	12	30	6	19	< 1	< 1	ND	ND	ND	ND		Wong <i>et al.</i> (2005)
Kraftsried	Industrial N-removal	16	47	2	ND	ND	ND	5	6	1	12		Juretschko <i>et al.</i> (2002)
A	Modified UCT	10 ± 4	17 ± 7	13 ± 4	8 ± 3	< 6	< 6	25 ± 7	ND	ND	ND		Beer <i>et al.</i> (2006)
B	3 stage bardenpho	27 ± 9	6 ± 4	< 7	23 ± 11	< 7	< 7	< 1	ND	ND	ND		Beer <i>et al.</i> (2006)
C	Carousel/UCT	35 ± 15	< 6	16 ± 7	10 ± 9	< 1	13 ± 6	< 6	ND	ND	ND		Beer <i>et al.</i> (2006)
D	3 stage bardenpho	19 ± 10	16 ± 11	7 ± 5	42 ± 14	< 1	< 6	10 ± 5	ND	ND	ND		Beer <i>et al.</i> (2006)
E	Modified UCT	66 ± 15	< 1	6 ± 5	22 ± 8	< 1	13 ± 9	29 ± 14	ND	ND	ND		Beer <i>et al.</i> (2006)
F	Carrousel/UCT	37 ± 18	6 ± 5	8 ± 4	16 ± 6	ND	11 ± 8	24 ± 11	ND	ND	ND		Beer <i>et al.</i> (2006)
G	Modified UCT	32 ± 12	9 ± 4	5 ± 2	12 ± 8	< 5	< 5	< 5	ND	ND	ND		Beer <i>et al.</i> (2006)
H	Modified UCT	30 ± 9	16 ± 11	7 ± 4	13 ± 8	< 1	13 ± 3	< 5	ND	ND	ND		Beer <i>et al.</i> (2006)
J	Modified UCT	33 ± 10	13 ± 9	17 ± 8	7 ± 6	< 5	< 6	15 ± 7	ND	ND	ND		Beer <i>et al.</i> (2006)

Figura 29. Composición de la comunidad bacteriana en diversas EDAR por análisis semi-cuantitativo FISH. ND= no detectado (Seviour y Nielsen, 2010).

En la figura 30 se muestra otro estudio encaminado al conocimiento de la diversidad de la comunidad bacteriana en una EDAR, mediante la técnica FISH (Kong *et al.*, 2007).

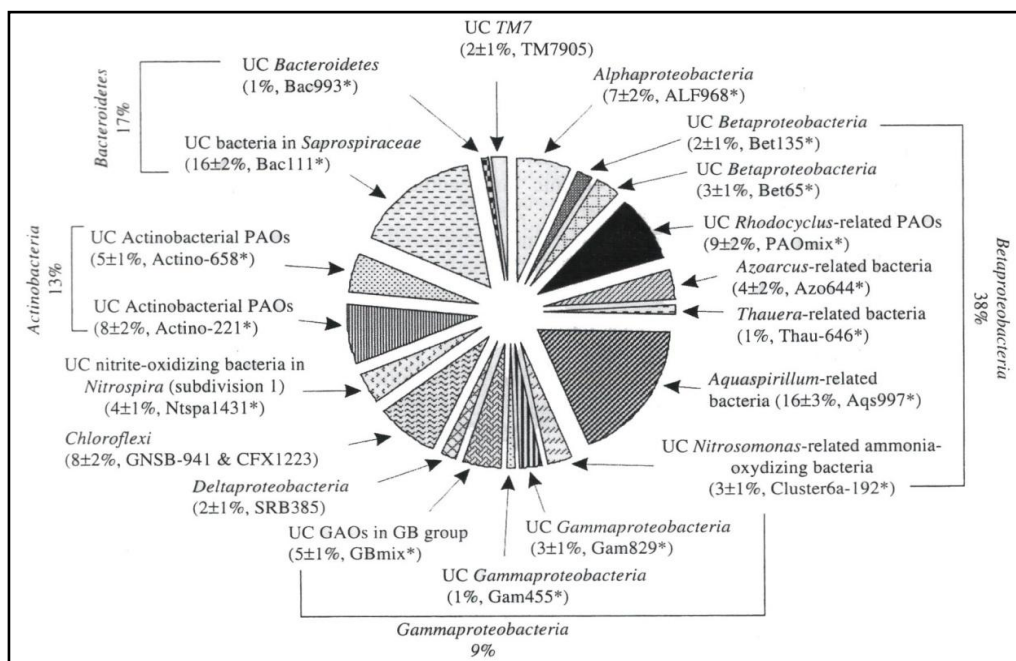


Figura 30. Composición de la comunidad de bacterias en una EDAR in Skagen Dinamarca, usando las sondas FISH. Los porcentajes son estimados según el total detectado con la sonda EUBmix. (Kong *et al.*, 2007).

1.8.1 Fijación de la biomasa para la hibridación

El primer paso necesario para llevar a cabo la técnica FISH es la fijación de los organismos. De esta forma se conserva su morfología y se favorece el acceso de las sondas. La fijación debe realizarse inmediatamente después de coger la muestra procedente de la planta de tratamiento de aguas residuales. Esto evita las lesiones que producirían cambios osmóticos y alteraciones estructurales y bioquímicos, fenómeno conocido como autólisis.

La fijación de las células depende mucho de la estructura de su membrana celular. La cantidad y la clase de proteínas de una membrana celular específica depende del ambiente en el que actúe la célula (Madigan *et al.*, 2004).

Las células Gram positivas tienen paredes celulares de capa gruesa de peptidoglucano. Por el contrario las células Gram negativa poseen una capa fina de peptidoglucano (Madigan *et al.*, 2004). Con el fin de comprender mejor la estructura de la membrana celular en las bacterias y la diferencia entre células Gram positivas (figura 31) y Gram negativas (figura 32), se describen a continuación 4 moléculas que podemos encontrar en la membrana de las células: la mureína, el lipopolisacárido, los ácidos teicoicos y los ácidos lipoteicoicos.

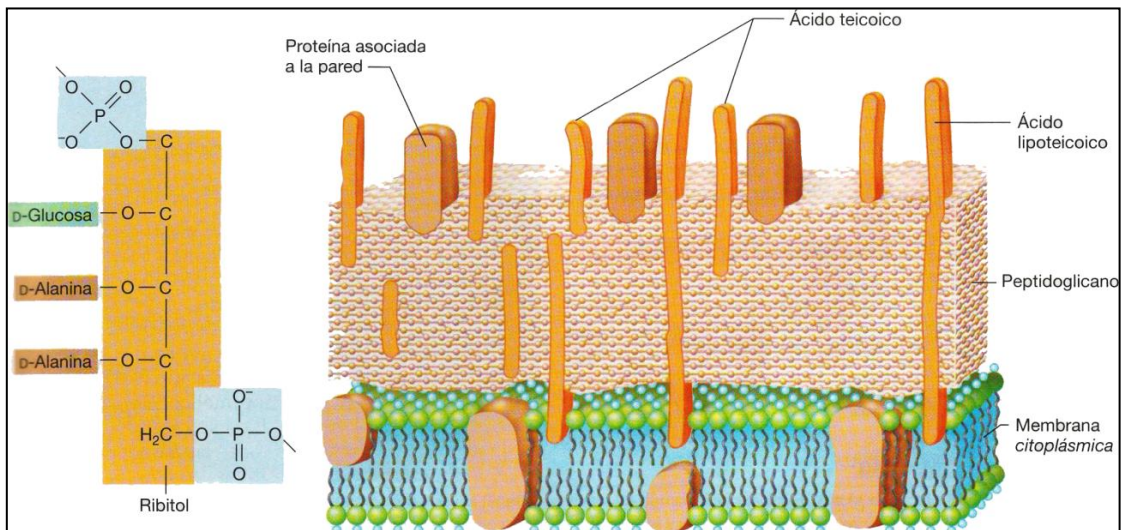


Figura 31. Estructura de la pared celular de las bacterias Gram positivas (Madigan *et al.*, 2004).

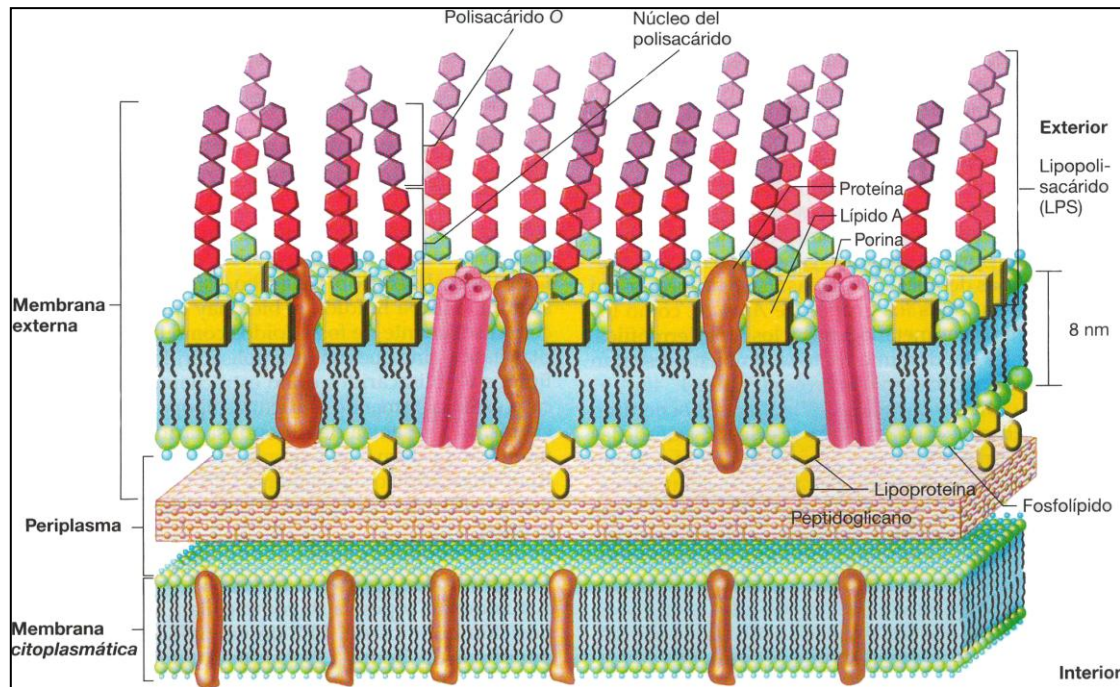


Figura 32. Estructura de la pared celular de las bacterias Gram negativas. (Madigan *et al.*, 2004).

Mureína.

La mureína es un peptidoglicano que se encuentra en las bacterias, con excepción de los mollicutes y de arqueas. Constituye la mayor parte de la pared celular y es responsable de la forma de la célula y de su integridad estructural, que proporciona rigidez a la misma. La mureína está compuesta de N-acetilglucosamina (NAG) y de ácido N-acetilmurámico (NAM) (figura 33), unido alternativamente por enlaces β -1,4-glucosídicos. Hay un tetrapéptido unido al NAM que puede unirse a su vez con el tetrapéptido de una cadena adyacente (Parés *et al.*, 1997).

Lipopolisacárido.

Los LPS son polímeros complejos con restos de ácidos grasos y cadenas de oligosacáridos y polisacáridos, que forman la parte mayoritaria de la capa externa de la membrana de bacterias Gram negativa. Esos polímeros básicamente se componen de una porción lipídica muy conservada entre las especies, denominada lípido A, inmersa en la cara externa de la membrana de la bacteria y una porción hidrofílica compuesta por azúcares que presentan una gran variabilidad estructural (Rojas, 1995).

Las Gram positiva no tienen LPS, pero pueden presentar ácidos teicoicos asociados a la mureína.

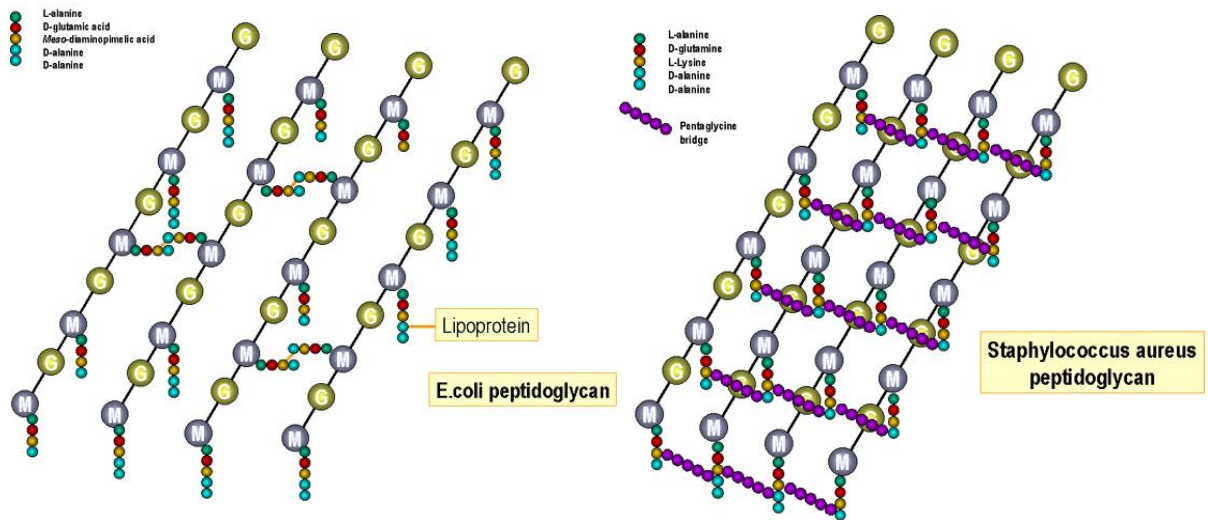


Figura 33. Representación esquemática de los peptidoglicanos. La figura de la izquierda (E. coli) corresponde a Gram negativa. La figura de la derecha (Staphylococcus) corresponde a Gram positiva (Figuerola, 2006).

Ácidos teicoicos.

Se trata de polímeros del glicerol o ribitol unidos por enlaces fosfodiéster y con uno o más aminoácidos como sustituyentes (Parés, *et al.*, 1997).

Ácidos lipoteicoicos (LTA).

Es un constituyente principal en las bacterias Gram positivas. Son ácidos teicoicos unidos a lipoglucanos de la membrana citoplasmática (Parés, *et al.*, 1997).

Por las diferencias en las estructuras celulares de las bacterias, a la hora de fijar las bacterias Gram negativa se puede hacer con paraformaldehído, con un período de tiempo menor que el necesario para fijar las bacterias Gram positiva.

Las bacterias Gram positiva al ser hidrofóbicas es necesario fijarlas con etanol como se describe en el capítulo de materiales y métodos.

Para permeabilizar la célula se utiliza detergentes como SDS (sodio dodecil sulfato) y en función de su pared celular el paraformaldehído o en su caso el etanol.

En la mayoría de las arqueas la pared celular se compone de proteínas que forman en la superficie una capa S (capa cristalina compuesta de proteínas y glicoproteínas). Una capa S es una agrupación rígida de moléculas proteicas que cubren el exterior de la célula. Esta capa ofrece protección química y física que puede servir de barrera impidiendo que entren en contacto macromoléculas con la membrana

celular. A diferencia de las bacterias, la mayoría de las arqueas carecen de peptidoglicano en la pared celular. Sin embargo en las arqueas metanogénicas encontramos pseudopeptidoglicano (polímero que carece de aminoácidos y ácido N-acetilmurámico o también conocido como NAM). Las arqueas poseen diversas paredes celulares que incluyen la pseudomureína (peptidoglicano no basado en NAM). Consiste en un esqueleto de unidades de NAG (N-acetilglucosamina) unidos con NAT (N-acetiltalosaminurónico) que es un azúcar exclusivo de estos organismos (figura 34) que se puede encontrar en las paredes celulares de *Methanobacterium*, la metanocondroitina (polímero basado en NAG, Glucurónico, glucosa y manosa) en *Methanosarcina* y glicoproteínas en *Methanococcus* y *Methanoplasnus* (Madigan *et al.*, 2004).

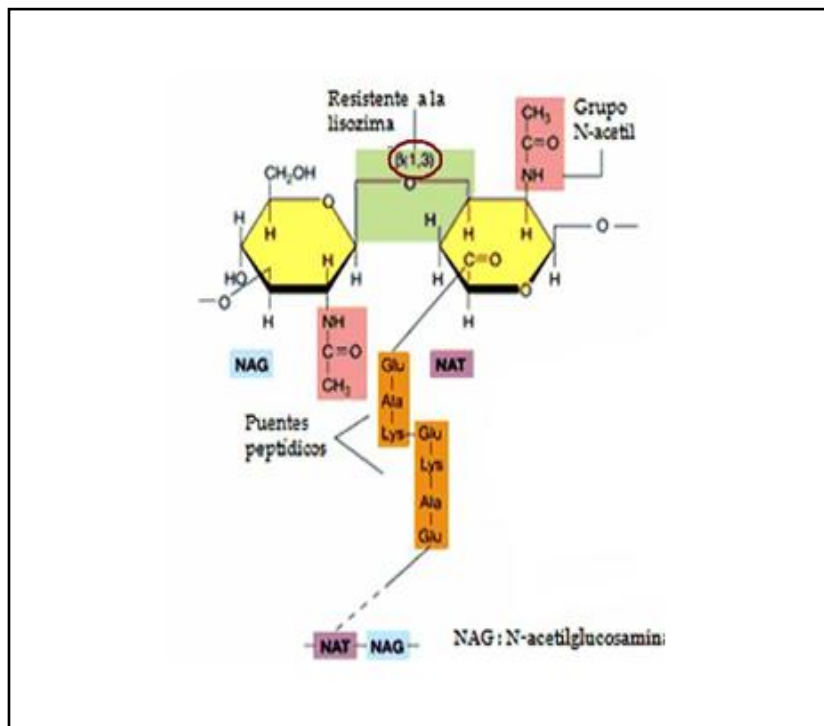


Figura 34. Peptidoglicano de la pared celular de arquea. (Madigan *et al.*, 2004).

1.8.2 Sondas

Las sondas o cadenas de oligonucleótidos son segmentos cortos de DNA de cadena simple que contienen de 15 a 30 nucleótidos. Estas sondas solo hibridan con sus secuencias complementarias en condiciones estrictas de hibridación.

Mediante el análisis de las secuencias parciales del 16S rRNA es posible encontrar patrones de secuencias específicos para grupos y especies de bacterias concretas. Para la identificación de los microorganismos a ese nivel, se ha desarrollado

pequeñas sondas específicas. La hibridación con sondas específicas permite la identificación rápida y directa de un gran número de microorganismos uniéndose a la secuencia diana. El uso combinado de sondas universales y específicas permite estimar la fracción de determinados microorganismos dentro de un conjunto.

La sonda está marcada de tal forma que los híbridos formados se pueden detectar fácilmente. La especificidad de las sondas puede ser ajustada a diferentes niveles taxonómicos, como son: dominio, phylum, clase, familia, género y especie, en la identificación de las bacterias en sus diferentes comunidades naturales (Amann *et al.*, 1995).

La sonda debe ser lo suficientemente específica para unirse únicamente a la bacteria que se quiere identificar en presencia de otras bacterias. Para asegurar la especificidad de las sondas, los dos parámetros determinantes son la temperatura y la concentración de formamida: Estos dos parámetros favorecen las condiciones de especificidad de la sonda. La formamida hace que disminuya la temperatura de unión de las sondas mediante el debilitamiento de los puentes de hidrógeno. Este compuesto disminuye la temperatura de fusión de los híbridos DNA:RNA en 0.72° C por cada 1% de formamida utilizada, esto permite realizar la hibridación entre 30 y 50° C (Morenilla *et al.*, 2009).

La sonda que se utiliza en la técnica FISH está formada por una pequeña secuencia de nucleótidos de cadena sencilla en cuyo extremo, normalmente el 5', se marca con un fluorocromo.

Objetivos

2 Objetivos

Ante el interés y la necesidad de mejorar los tratamientos de aguas residuales en las EDAR, es importante conocer la comunidad microbiana existente en los fangos activos. La identificación y cuantificación de las poblaciones microbianas específicas es fundamental para el estudio de los mecanismos que subyacen en los procesos biológicos. Por lo tanto, este trabajo consiste en un estudio de la posible variación de la población de bacterias y arqueas en las diferentes épocas del año en una EDAR. Así mismo, se pretende estudiar la existencia de relaciones de abundancia microbiana con las variables físico-químicas y operacionales en la EDAR de la cuenca del Carraixet.

Las poblaciones bacterianas y de arqueas que comprenden las aguas residuales son tan diversas que partimos de un análisis a nivel phylum en cada dominio (arquea y bacteria), seguido de un análisis a nivel de fenotipo (grupos funcionales).

Para la consecución de los objetivos generales se ha planteado una serie de objetivos específicos. Estos objetivos son:

1. Identificar los phylum bacterianos y de arqueas presentes en las muestras de fangos activos.
2. Cuantificar las bacterias de cada phylum encontrado.
3. Conocer la variación de abundancia de los diferentes phylum encontrados a lo largo del muestreo y comparar los resultados en ambas líneas.
4. Conocer mediante métodos estadísticos las posibles relaciones entre los resultados de la identificación y cuantificación de las comunidades de bacterias y arqueas (phylum y clase) con los datos físico-químicos y operacionales de la EDAR.
5. Identificar los grupos fenotípicos de bacterias y arqueas de interés para el diseño de las EDAR (grupos funcionales) en el proceso de fangos activos.
6. Cuantificar los organismos identificados por grupo funcional.
7. Conocer la variación de la abundancia de los grupos funcionales durante el muestreo.

8. Conocer mediante métodos estadísticos las posibles relaciones entre los resultados de la identificación y cuantificación de los grupos funcionales con datos físico-químicos y operacionales.

9. Conocer mediante métodos estadísticos las posibles relaciones entre los resultados de las poblaciones identificadas a lo largo del muestreo con datos biológicos (recuento de protozoos) obtenidos de un estudio previo de la EDAR.

Materiales y Métodos

3 Materiales y Métodos

3.1 Materiales y Métodos

Con la técnica molecular FISH se realiza el análisis de las muestras procedentes de una EDAR de la comunidad Valenciana. En este capítulo se describe la EDAR de la que se tomó las muestras, el procedimiento realizado para la hibridación por medio de FISH, el análisis y cuantificación de imágenes y el análisis estadístico de los resultados.

3.1.1 Procedencia de la muestra

Las muestras provienen del reactor aerobio de la planta de tratamiento de aguas residuales urbanas de la Cuenca del Carraixet, ubicada en la Comunidad Valenciana.

El caudal de funcionamiento de la planta de tratamiento es de 37.280 m³/día, el rendimiento del tratamiento es del 98% de eliminación de los sólidos suspendidos, del 98% DBO₅ y el 95% de DQO. La EDAR no está diseñada para eliminación de nutrientes. La planta sirve a 13 municipios con un total de población de 156.545 habitantes-equivalentes. Las aguas residuales que llegan a esta planta tienen un importante componente industrial.

El tratamiento biológico que se lleva a cabo en la EDAR es de fangos activos, constando la línea de agua de dos líneas de tratamiento biológico. El tanque de aireación de la línea 1 tiene una capacidad de 4192 m³ y en la línea 2 la capacidad del tanque de aireación es de 6273 m³. La aireación se realiza por medio de difusores.

La línea de fangos está constituida por un espesador de gravedad para el fango primario y otro por flotación para el fango secundario, que alimentan la entrada del fango al tanque de digestión anaerobia (figura 35).

Las muestras utilizadas para esta tesis son muestras tomadas para un estudio de la EPSAR (Entidad Pública de Saneamiento de Aguas Residuales). El muestreo fue realizado en periodos de 15 días durante un año (excepto el mes de agosto).

Las muestras fueron tomadas de las dos líneas del sistema de fangos activos con las que cuenta la planta. En total se obtuvieron 44 muestras (22 muestras por línea de tratamiento).

Cada línea de tratamiento consta de dos reactores. Las muestras se tomaron a la salida de cada línea.

Cada muestra fue fijada inmediatamente después de su extracción. La fijación se realizó según procedimiento descrito en el apartado 3.2 del capítulo materiales y métodos.

Una vez fijadas, las muestras fueron almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su conservación antes de los estudios pertinentes en el proyecto de la EPSAR.

Cada muestra fue hibridada según procedimiento descrito en el apartado 3.2 de este capítulo con las sondas respectivas de interés para este estudio.

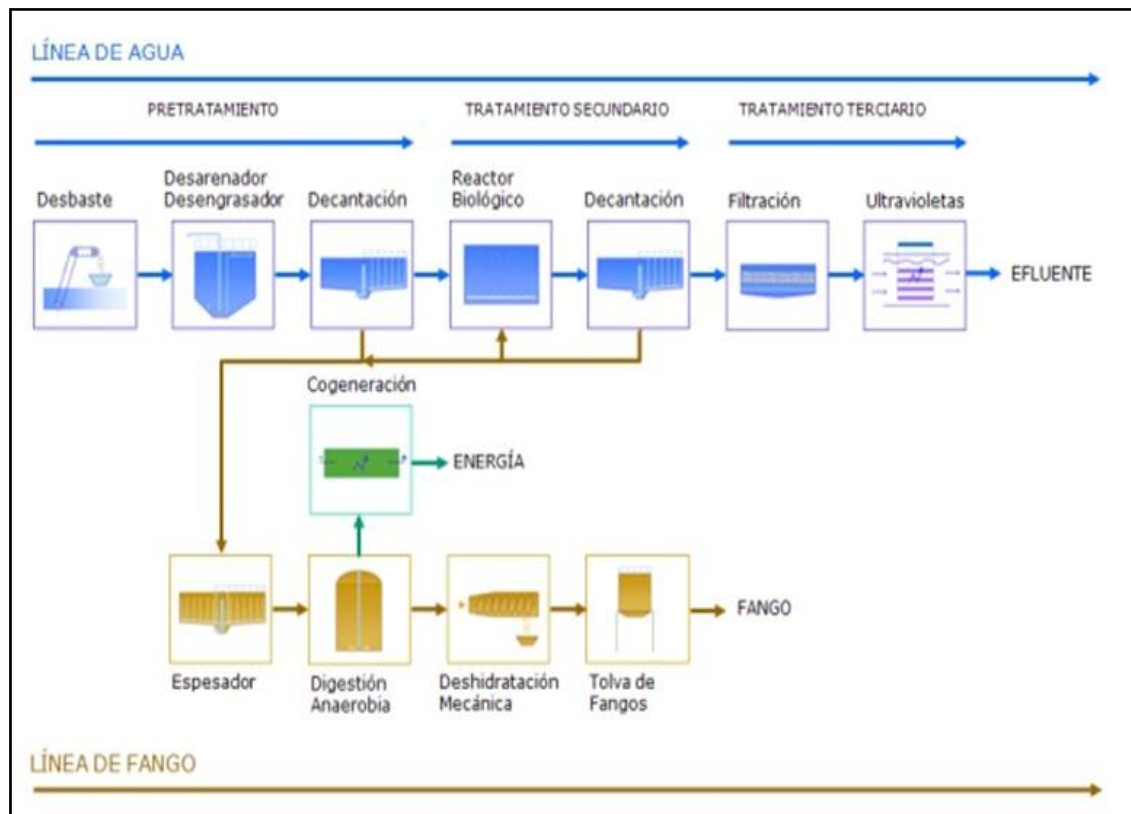


Figura 35. Esquema de la EDAR del Carraixet (EPSAR).

3.1.2 Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

Para aplicar la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) con sondas marcadas con fluorocromos se debe adecuar previamente la muestra. Esto implica la fijación y permeabilización de la pared celular para inactivar las células microbianas y la

actividad enzimática. La permeabilización de la células tiene como objetivo ayudar a la penetración de la sonda (Nielsen *et al.*, 2009).

Una vez fijadas las células se aplica la técnica de hibridación FISH, lo que permite realizar un análisis cualitativo y cuantitativo de la población microbiana presente en la muestra tratada. La hibridación se realiza mediante diferentes sondas (fragmentos de DNA). El uso de cada sonda depende de cada grupo de bacterias y permite identificar las bacterias presentes en la muestra.

3.2 Procedimiento

La fijación celular se realiza del siguiente modo:

Para las bacterias Gram negativa se realiza la fijación con Paraformaldehido (PFA al 4%).

- Depositar 1 ml de muestra en un vial.
- Someter a centrifugación (7000 rpm durante 3 min) y eliminar sobrenadante.
- Añadir PFA (750 µl) y PBS (250 µl) y mantener a 4 °C durante 3 horas.
- Someter las células a centrifugación (7000 rpm durante 3 minutos) y eliminar el paraformaldehido.
- Lavar las células PBS 1X (fosfato búfer salino), centrifugar (7000 rpm durante 3 minutos) y eliminar el sobrenadante.
- Repetir el paso anterior si es necesario.
- Resuspender las células en 500µl de PBS 1X y en 500 µl de etanol absoluto frío (4°C).
- Guardar a -20°C.

Para las bacterias Gram positiva se realiza la fijación con etanol absoluto frío.

- Depositar 1 ml de muestra en un vial.
- Centrifugar (7000 rpm durante 3 minutos) y eliminar sobrenadante.
- Lavar las células con PBS 1X (1000 µl).
- Centrifugar (7000 rpm durante 3 minutos) y eliminar sobrenadante.
- Resuspender en 500 µl de PBS 1X y en 500 µl de etanol absoluto frío (4°C).
- Guardar a -20°C.

Tratamiento de los portaobjetos cubiertos con Teflón

El tratamiento de los portaobjetos tiene como objetivo el poder mantener sobre él mismo la mayor cantidad de células posibles y por más tiempo, evitando la pérdida de las células por los lavados previos y posteriores a la visualización en el microscopio.

El tratamiento se lleva a cabo de la siguiente manera:

- Lavar con agua y detergente neutro.
- Enjuagar con agua destilada.
- Secar a temperatura ambiente (es importante secar completamente).
- Cubrir con gelatina por inmersión en la solución de gelatina 0.1% con sulfato potásico cromato 0.01% (preparada en el momento, T= 60 °C).
- Secar al aire (proteger del polvo ambiental).

Hibridación in situ FISH

1. Aplicación de la muestra en los portaobjetos cubiertos de teflón

- Poner un volumen de 5 μ l de muestra fijada en cada pocillo del portaobjetos.
- Secar al aire.
- Deshidratar en etanol al 50% durante 3 minutos por inmersión.
- Deshidratar en etanol al 80% durante 3 minutos por inmersión.
- Deshidratar en etanol al 98% durante 3 minutos por inmersión.
- Después del deshidratado se deja secar y los portaobjetos pueden ser conservados indefinidamente a -20°C.

2. Hibridación “in situ”

Las reacciones de hibridación se hacen a concentraciones altas de NaCl y en presencia de agentes desnaturalizantes como la formamida. El NaCl y el porcentaje de formamida hacen que la hibridación sea estable.

Para ello se prepara la solución de hibridación:

a). Preparación de la solución de hibridación (tubo eppendorf 2 ml)

- Añadir 360 μ l de NaCl 5M.
- Añadir 40 μ l TrisHCl 1M.
- Añadir formamida según Tabla 5.
- Añadir agua MilliQ según Tabla 5.
- Añadir 2 μ l de SDS al 10%.
- Mezclar cuidadosamente.

Tabla 5. Cantidades de formamida y agua para la preparación de la solución de hibridación

Cantidad de formamida (μ l)	% formamida para la sonda	Cantidad de agua MilliQ (μ l)
0	0	1598
100	5	1498
200	10	1398
300	15	1298
400	20	1198
500	25	1098
600	30	998
700	35	898
800	40	798
900	45	698
1000	50	598
1100	55	498
1200	60	398

Una vez preparada la solución de hibridación se procede del siguiente modo:

- Poner (10 μ l- μ l de sonda o sondas) de la solución de hibridación en cada pocillo del portaobjeto que lleve muestra.
- Poner 1 μ l de la sonda o sondas a utilizar y repartir homogéneamente por todo el pocillo.
- Introducir el portaobjetos con la solución de hibridación y las sondas a la cámara de hibridación (tubo tipo falcon de 50 ml previamente preparado con papel de celulosa dentro). Una vez dentro el portaobjetos a hibridar el tubo se debe mantener siempre en posición horizontal.
- Incubar a 46°C durante 1-2 horas.

Con el fin de eliminar los restos de sondas no hibridadas y la formamida de los portaobjetos se prepara una solución de lavado.

b). Preparación de la solución de lavado

- En un tubo tipo falcon de 50 ml añadir según Tabla 6, las cantidades indicadas de NaCl 5M dependiendo del porcentaje de formamida utilizada en la solución de hibridación.
- Añadir 1 ml de TrisHCl.
- Añadir EDTA si según Tabla 6 se requiere.
- Aproximar a 50 ml con agua MilliQ.
- Añadir 50 μ l de SDS 10%.
- Mezclar cuidadosamente.

Tabla 6. Cantidades de NaCl para la solución de lavado

% formamida de la sonda	NaCl (M)	NaCl 5M (μ l)	EDTA 0.5 M (μ l)
0	0.900	9000	---
5	0.636	6300	---
10	0.450	4500	---
15	0.318	3180	---
20	0.225	2150	500
25	0.159	1490	500
30	0.112	1020	500
35	0.080	700	500
40	0.056	460	500
45	0.040	300	500
50	0.028	180	500
55	0.020	99	500
60	0.014	41	500

Terminado el tiempo de incubación del portaobjetos donde están las células a hibridar se procede a:

- Sacar de la incubadora el portaobjetos. Con la ayuda de un cuentagotas y la solución de lavado previamente preparada eliminar la formamida que aun esté en los pocillos. Para eliminar las sondas no hibridadas introducir el portaobjetos dentro del tubo con la solución de lavado y mantenerlo en un baño de agua a 48 °C durante 10- 15 min y protegido de la luz.
- Una vez concluido el tiempo de lavado, se saca el portaobjetos de la solución de lavado y se sumerge en un vaso con agua MilliQ fría durante 1 segundo.
- Secar el portaobjetos a temperatura ambiente protegiéndolo de la luz.
- Si no se observa inmediatamente en el microscopio, guardar a -20°C.

3.2.1 Sondas

Las sondas utilizadas en este trabajo se han adquirido ya marcadas a través de Thermo Scientific.

En la tabla 7 se muestran las sondas generales para identificación del dominio bacteria y arquea usadas en este trabajo así como su referencia bibliográfica. Las sondas descritas en la tabla 7 están marcadas con el fluorocromo fluoresceína (FAM).

Para el uso de las sondas EUB338, EUB 38II, EUB338 III y la EUB338IV se realizó una mezcla de ellas, la sonda EUBmix. La mezcla tiene como fin cubrir el

mayor número de bacterias posibles en la muestra, sin embargo a este mix se le agregó la sonda ARCH915 con el fin de cubrir los dos dominios estudiados en este trabajo.

Tabla 7. Sondas generales

Sonda	Secuencia	%FA	Organismo	Referencia
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	0-50	Muchas bacterias	Amann <i>et al.</i> , 1990
EUB338II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	0-50	<i>Planctomycetales</i>	Daims <i>et al.</i> , 1999
EUB338III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	0-50	<i>Verrucomicrobiales</i>	Daims <i>et al.</i> , 1999
EUB338IV	GCAGCCTCCCGTAGGAGT	0-50	Phylum <i>Eubacteria*</i>	Schmid <i>et al.</i> , 2005
ARCH915	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	35	<i>Arqueas</i>	Stahl y Amann 1991

*Phylum no cubiertos por las otras sondas EUB 338, 338II y 338III.

Igualmente se usaron sondas específicas. En la tabla 8 se describen las sondas específicas para el dominio arquea. Todas las sondas de la tabla 8 están marcadas con el fluorocromo TAMRA. En esta tabla se puede apreciar los porcentajes de formamida de trabajo de cada sonda, su secuencia y su referencia bibliográfica.

Tabla 8. Sondas para las Arqueas

Sonda	Secuencia	%FA	Organismo	Referencia
ARCH915	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	35	<i>Archaea</i>	Stahl y Amann 1991
Cren679	TTTTACCCCTTCCTCCG	35	<i>Candidatus Nitrosopumilus maritimus</i>	Labrenz <i>et al.</i> , 2010
MSMX860	GGCTCGCTTCACGGCTTCCT	45	<i>Methanosarcinales</i>	Devereux <i>et al.</i> , 1992
MG1200b	CRGATAATTCGGGGCATGCTG	20	<i>Methanomicrobiales</i>	Devereux <i>et al.</i> , 1992
MB311	ACCTTGCTCAGGTTCCATCTCC	30	<i>Methanobacteriales</i>	Devereux <i>et al.</i> , 1992
MC504	GGCTGCTGGCACCGACTTGCC CA	55	<i>Methanocaldococcaceae</i>	Devereux <i>et al.</i> , 1992
MC504 Compet	GGCTGCTGGCACCGAACTTGCC CA			
MC1109	GCAACATAGGGCACGGTCT	45	<i>Methanococcales</i>	Fukui <i>et al.</i> , 1999

Para el dominio bacteria, a nivel de phylum se usaron las sondas que se describen en la tabla 9, todas las sondas de esta tabla están marcadas con el fluorocromo TAMRA.

Tabla 9. Sondas para cada phylum bacteriano

Sonda	Secuencia	%FA	Organismo	Referencia
CFX1223	CCATTGTAGCGTGTGTGTMG	35	<i>Cloroflexi</i>	Björnsson <i>et al.</i> , 2002
GNSB941				Gich <i>et al.</i> , 2001
Ntspa712	CGCCTTCGCCACCGGCCTTCC	50	<i>Nitrospirae</i>	Daims <i>et al.</i> , 2001
Ntspa712 compet	CGCCTTCGCCACCGGTGTTCC			
ALF968	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	20	<i>α-Proteobacteria</i>	Neef, 1997
BET42a	GCCTTCCCACCTTCGTTT	35	<i>β-Proteobacteria</i>	Manz <i>et al.</i> , 1992
BET42a compet	GCCTTCCCACATCGTT			
GAM42a	GCCTTCCC CATCGTTT	35	<i>γ-Proteobacteria</i>	Manz <i>et al.</i> , 1992
GAM42a compet	GCCTTCCCACCTTCGTTT			
DELTA495a	AGTTAGCCGGTGCTTCTT	35	<i>δ-Proteobacteria</i>	Loy <i>et al.</i> , 2002
DELTA495a compet	AGTTAGCCGGTGCTTCTT			
DELTA495b	AGTTAGCCGGCGCTTCTT			
DELTA495b compet	AGTTAGCCGGCGCT CKT			
DELTA495c	AATTAGCCGGTGCTTCTT			
DELTA495c compet	AATTAGCCGGTGCTTCTT			
EPSY549	CAGTGATTCCGAGTAACG	35	<i>ε-Proteobacteria</i>	Lin <i>et al.</i> , 2006
LGC354a	TGGAAGATTCCCTACTGC	35	<i>Firmicutes</i>	Meier <i>et al.</i> , 1999
LGC354b	CGGAAGATTCCCTACTGC			
LGC354c	CCGAAGATTCCCTACTGC			
HGC69a	TATAGTTACCACCGCCGT	25	<i>Actinobacteria</i>	Roller <i>et al.</i> , 1994
HGC69a compet	TATAGTTACGGCCGCCGT			
PLA46	GACTTGCATGCCTAATCC	30	<i>Planctomycetales</i>	Neef <i>et al.</i> , 1998
SS_HOL1400	TTCGTGATGTGACGGGC	20	<i>Acidobacteria</i>	Meisinger <i>et al.</i> , 2007
CF319b	TGGTCCGTATCTCAGTAC	35	<i>Flavobacterias y Sphingoba</i>	Manz <i>et al.</i> , 1996

Para la identificación de los grupos funcionales de las bacterias se usaron sondas específicas que se detallan en la tabla 10. Todas las sondas están marcadas con el fluorocromo TAMRA.

Tabla 10. Sondas usadas para la detección de los grupos funcionales

Sonda	Secuencia	% FA	Organismo	Referencia
NSO1225LNA	CGCCATTGTATTACGTGTGA	45	<i>β-Proteobacteria ammonia-oxidizing</i>	Alonso <i>et al.</i> , 2009
NIT3	CCTGTGCTCCATGCTCCG	40	<i>nitrobacter</i>	Wagner <i>et al.</i> , 1996
PAO462	CCGTCATCTACWCAGGGTATTAAC	35	<i>candidatus accumulibacter phosphatis</i>	Crocetti <i>et al.</i> , 2000
PAO651	CCCTTGCCAAACTCCAG			
PAO846	CTTAGCTACGGCACTAAAAGG			
GAOQ431	TCCCCGCCTAAAGGGCTT	35	<i>candidatus competibacter phosphatis</i>	Crocetti <i>et al.</i> , 2002
GAOQ989	TTCCCCGGATGTCAAGGC			
TFO_DF218	GAAGCCTTTGCCCTCAG	35	<i>Defluviococcus (cluster 1)</i>	Wong <i>et al.</i> , 2004
TFO_DF618	GCCTCACTTGTCTAACCG			
DF988	GATACGACGCCATGTCAAGGG	35	<i>Defluviococcus (cluster 2)</i>	Meyer <i>et al.</i> , 2006
H966(COMPET1 DF988)	CTGGTAAGGGTTCTGCGGTTGC			
H1038(COMPET2 DF988)	AGCAGCCATGCAGCACCTGTATGGCGT			
DF1020	CCGGCCGAACCGACTCCC			
Ma464	TTATCCAGGTACCGTCATTA	20	<i>tipo2 methylocystaceae(α-Proteobacteria)</i>	Eller <i>et al.</i> , 2001
Mg84	CCACTCGTCAGCGCCCGA	20	<i>tipo1 methylococcaceae(γ-Proteobacteria)</i>	
AT1458	GAATCTCACCGTGGTAAGCGC	50	<i>azoarcus-thauera-cluster</i>	Rabus <i>et al.</i> , 1999
PAR651	ACCTCTCTCGAACTCCAG	40	<i>paracoccus</i>	Neef <i>et al.</i> , 1996
TBD1419	ACTTCTGCCAGATCCAC	50	<i>thiobacillus denitrificans</i>	Fernandez <i>et al.</i> , 2008
DSV687	TACGGATTTCACTCCT	15	<i>desulfovibrio, desulfomonas, desulfuromonas, desulfomicrobium</i>	Devereux <i>et al.</i> , 1992
Dsb804	CAACGTTTACTGCGTGGA	10	<i>some desulfobacteraceae</i>	
DNMA657	TTCCGCTTCCCTCTCCATA	30	<i>some desulfonema</i>	Fukui <i>et al.</i> , 1999
DBB660	GAATCCACTTTCCCCTCTG	60	<i>some desulfobulbus</i>	Devereux <i>et al.</i> , 1992
Dtm230	TAATGGGACGCGGACCCA	10	<i>many desulfotomaculum cluster 1 and other firmicutes</i>	Hristova <i>et al.</i> , 2000
SRB385	CGGCGTCGCTGCGTCAGG	35	<i>most desulfovibrionales and other bacteria</i>	Amann <i>et al.</i> , 1990
SRB385Db	CGGCGTTGCTGCGTCAGG	30	<i>desulfobacteraceae</i>	Rabus <i>et al.</i> , 1996
Clos621	CAAACGCAGTCCATGAGT	20	<i>Clostridium spp.</i>	Liu <i>et al.</i> , 2002)
Strep	CACTCTCCCCTTCTGCAC	40	<i>Streptococcus</i>	Trebesius <i>et al.</i> , 2000

Por último, en la tabla 11 se muestra las sondas utilizadas para el análisis de células eucariotas.

Tabla 11. Sondas para la detección de Eucaryota

Sonda	Secuencia	%FA	Organismo	Referencia
EUBK1193	GGGCATMACDGACCTGTT	20-35	Eukarya	Baker <i>et al.</i> , 2003
EUBK503	GGCACCAGACTKGYCCTC			
EUBK310	TCAGGCBCCYTCTCCG			
PF2	CTCTGGCTTCACCCTATTC	30	Levaduras	Kempf <i>et al.</i> , 2000
NCHLO01	GCTCCACTCCTGGTGGTG	ND	Algas no clorofitas	Simon <i>et al.</i> , 1995
CHLO01	GCTCCACGCCTGGTGGTG	ND	<i>Algas clorifitas</i>	

*ND, no determinada

Con las sondas EUBK1193, EUBK503 y EUBK310 se hizo una mezcla para el trabajo. A ésta mezcla se la llamó EUBKmix.

3.2.2 Cuantificación de los microorganismos

Para la cuantificación de las células después de la aplicación de la técnica FISH se lleva a cabo la observación en el microscopio y la toma de imágenes.

La observación se realizó en un microscopio de epifluorescencia Olympus BX50. Las fotografías se realizaron con una cámara digital integrada al microscopio modelo Olympus DP10. El equipo cuenta con los filtros U-MWIB con una longitud de onda de 450-480 nm y de emisión de 515 nm (Fluoresceína, FAM) y U-MWIG con una longitud de onda de 510-550 nm y de emisión de 590 nm (Rodamina, TAMRA).

La toma de imágenes se realiza en un mínimo de 20 campos distintos y representativos en cada canal de la muestra hibridada (cada canal con el filtro correspondiente para cada fluorocromo). Un canal es para las sondas de interés marcadas con el fluorocromo TAMRA con una longitud de onda de excitación de 555 nm y de emisión 580 nm (de color rojo), y el otro canal para la sonda general marcada con el fluorocromo FAM con una longitud de onda de 494 nm y de emisión de 518 nm (de color verde). En total para el desarrollo de ese trabajo se realizaron **46992 fotografías**.

Es importante en el momento de realizar las fotografías evitar la pérdida de la fluorescencia durante la visualización en el microscopio, para ello a cada muestra se le agrega una gota de *Vectashield* (Líquido de montaje con base de glicerol).

Después de la captura de las imágenes se realiza un análisis de las mismas. Para llevar a cabo este punto se utiliza el programa matemático MATLAB. El procedimiento consiste en descomponer las imágenes a escala de grises, es decir de una figura de espacio de color RGB (Red-Green-Blue) se pasa a una figura en escala de grises donde el rango de valores de pixeles va de 0 (Negro) a 255 (blanco).

Las imágenes son introducidas en un *software* de cuantificación desarrollado para este fin en la tesis doctoral de Borrás, 2008. El cambio de las imágenes de color a escala de grises facilita el conteo de pixeles (figura 36). El *software* de cuantificación tiene dos parámetros para ir variando según las imágenes a analizar, *Low_in* y *Gamma_in*. Con el primero se consigue eliminar la parte de la figura que representa la señal de fondo (*background*). Los valores van de 0 a 1. Por debajo del valor que se establece se considera un falso positivo (Borrás, 2008). El parámetro *Gamma_in* representa la forma de la curva que describe la relación entre los valores de la intensidad de luz de la figura original y la nueva figura. Cuando *Gamma_in* es menor a 1 la nueva figura tendrá una intensidad de luz más alta, es decir más brillante, si por el contrario este parámetro es superior a 1 la nueva figura será más oscura que la original (Borrás, 2008).

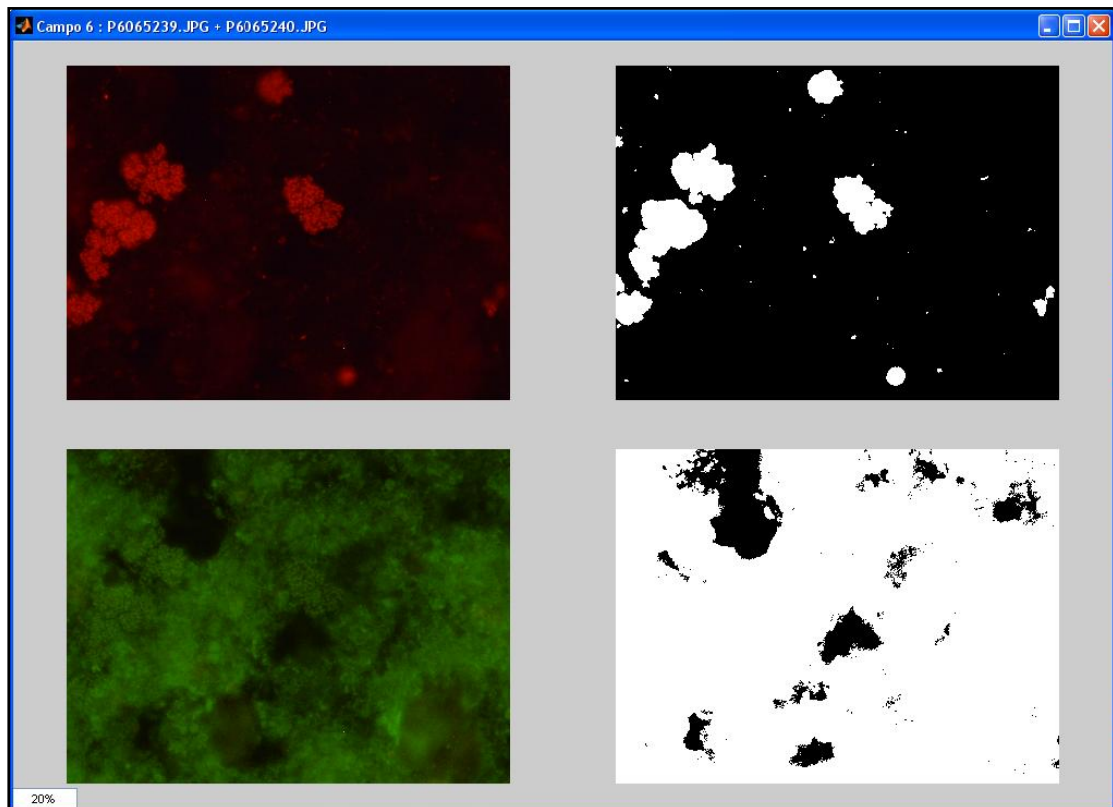


Figura 36. Descomposición a escala de grises por el MATLAB.

El *software* realiza un informe donde se presenta los porcentajes de las áreas ocupadas por las bacterias hibridadas acompañado del error de la medida. Éste último se calcula como $\frac{\sigma}{\sqrt{n}}$, donde:

σ : desviación estándar

n: número de campos

El programa genera y abre una hoja de cálculo donde se puede ver el informe detallado de los resultados de la cuantificación (áreas ocupadas por las bacterias presentes en la muestra hibridada) para cada campo y para el total de las imágenes, así como un gráfico de los porcentajes hibridados (figura 37).

El resultado final es un número que representa el porcentaje en área de un grupo bacteriano en la muestra acompañado de su incertidumbre de cuantificación (Borrás, 2008).

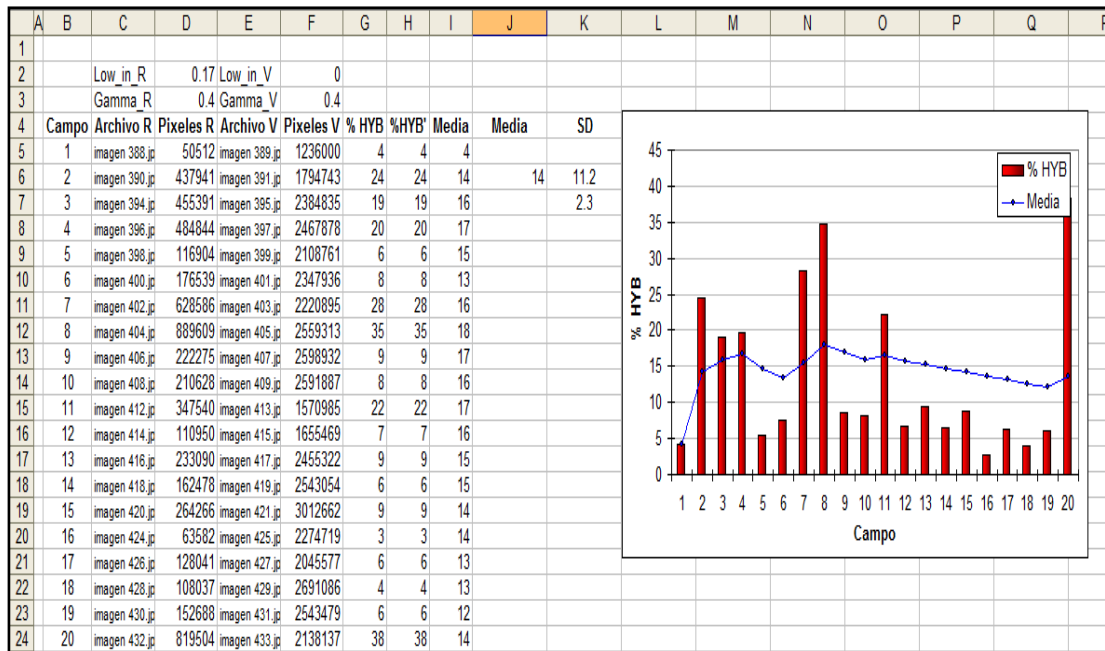


Figura 37. Hoja de cálculo que genera el programa de cuantificación.

El programa de cuantificación no tiene suficiente precisión como para cuantificar poblaciones de bacterias menores del 1%. Cuando el resultado de la cuantificación es menor al 1% le asignamos el valor de 0.5% para indicar que hay presencia de la población en cuestión así como también para su representación gráfica.

3.2.3 Problemas asociados con la detección de la fluorescencia

La inaccesibilidad de las sondas al ribosoma puede causar ausencia de señal o baja fluorescencia (poca señal). Esto puede remediarse mediante la aplicación de sondas *helpers* (sondas de ayuda). Las sondas *helpers* se diseñan para hibridar sin marcar sobre secuencias de rRNA junto a la sonda FISH en su lugar de destino. Las sondas de ayuda abren las estructuras secundarias y terciarias de la base de los nucleótidos para que con ello se aumente la accesibilidad de la sonda FISH (Nielsen *et al.*, 2009).

Otra solución para hibridar en las regiones de difícil acceso ha sido alargar el tiempo de hibridación (hasta 72 horas), lo cual mejora la difusión de la sonda en la célula y disminuye las barreras cinéticas de la accesibilidad del lugar de destino. De esta forma se consigue una mejor eficiencia de hibridación y, en general, las señales de fluorescencia aumentan de intensidad (Nielsen *et al.*, 2009).

La señal de hibridación también puede aumentar debido a la unión no específica de las sondas a los contaminantes unidos sobre la membrana celular, como pudieran ser sustancias húmicas y fragmentos de DNA unidos a la membrana celular. Esto inmoviliza al rRNA y puede producir un incremento de la hibridación (falsos positivos) debido a la unión no específica de la sonda. También es posible, sin embargo, que las sustancias húmicas o los fragmentos de DNA interfieran con la hibridación de la sonda al rRNA. De esta manera la señal de hibridación disminuye (Salazar 2008).

Para no perder la intensidad de fluorescencia se debe evitar la exposición demasiado larga a fuentes de luz fuertes, almacenar siempre los portaobjetos FISH en la oscuridad, retirar con cuidado todas las trazas de etanol de muestras almacenadas, ya que el etanol puede hacer desaparecer la señal de fluorescencia. Por último, se debe evitar los tiempos de fijación demasiado largos (sobre todo para la fijación mediante PFA), ya que los tiempos excesivos pueden reducir la permeabilidad de la célula por la sonda (Nielsen *et al.*, 2009).

3.3 Pretratamiento enzimático

Para algunos grupos de bacterias es necesario realizar un pretratamiento enzimático antes de la hibridación para lograr la penetración de la sonda marcada a la célula. Las enzimas usadas en este pretratamiento son la lisozima y mutanolisina. Los grupos bacterianos de células Gram positiva son de difícil penetración por la sonda, por lo que requieren de enzimas que ocasionen una lesión celular que hace vulnerable a la célula para su penetración con la sonda marcada.

La aplicación del pretratamiento depende del tipo de célula, así como también de la enzima aplicada. Para este trabajo se realizó una prueba de penetración enzimática para las bacterias Gram positiva y arqueas.

De forma general los procedimientos son:

Lisozima

Las células una vez inmovilizadas (fijadas), depositadas en los portaobjetos y deshidratadas con etanol, se aplica 10-15 µl de lisozima en frío (36 000-360 000 U/ml) por cada muestra. Se mantiene el portaobjetos horizontalmente en una cámara de incubación (falcon de 50 ml con papel húmedo de agua MiliQ para mantener la humedad de la cámara y evitar el secado de la enzima) con un tiempo de incubación de 10-60 min. La temperatura depende del tipo de célula (Nielsen *et al.*, 2009).

Pasado el tiempo de digestión enzimática se procede a lavar tres veces con agua MiliQ y una vez con etanol, se deja secar a temperatura ambiente. Después de este tratamiento se realiza la hibridación FISH.

Mutanolisina

Después de la inmovilización y deshidratación de las muestras en los portaobjetos se aplica 10-15 μ l de mutanolisina (5000 U/ml) sobre las muestras. Se deja horizontalmente 10-30 min en la nevera (4°C) cubiertos para evitar posibles contaminaciones. Pasado el tiempo para que la mutanolisina actúe, se procede a lavar tres veces con agua MiliQ y una vez con etanol, se deja secar a temperatura ambiente. Después del pretratamiento se realiza la hibridación FISH (Nielsen *et al.*, 2009).

Para la prueba del pretratamiento enzimático se llevo a cabo con otra muestra procedente de la línea 1 de la EDAR del Carraixet. La muestra fue tomada un mes después de la última toma de muestra de estudio.

Para la realización de las pruebas de penetración celular se sembró en agar *Escherichia coli* (γ -*Proteobacteria*) y *Enterococcus faecalis* (*Firmicutes*). Una vez crecidas las bacterias se cogió muestra para fijar.

La fijación se realizó con tres variantes. La primera consistió en la fijación con etanol, recomendada para Gram positiva (Roller *et al.*, 1994; Amann *et al.*, 1995; Meier *et al.*, 1999); la segunda fijación fue 1 hora con PFA (Thurnheer *et al.*, 2004); la tercera fue para Gram negativa (Amann *et al.* 1990).

El tratamiento enzimático utilizado fue para las *Firmicutes* fijadas como Gram positiva y como Gram negativa de 20 min de lisozima y para las muestras con 1 hora con PFA el tiempo del tratamiento enzimático fue de 9 min (Thurnheer *et al.*, 2004).

3.4 Análisis de la Figura de la señal de Hibridación

Para evaluar la intensidad de la señal de hibridación en las muestras durante la prueba de la lisozima en las células Gram positiva se realizó un análisis con el programa Olympus DP Soft versión 3.2. El programa mide píxeles de las fotografías de las señales de hibridación.

Para ellos se ha medido la intensidad de la señal de hibridación del fluorocromo TAMRA unido a la sonda. Se han realizado 20 medidas de intensidad y se ha calculado la media. Este valor se utiliza para comparar la intensidad de la señal de los procedimientos de hibridación empleados. Se ha realizado un análisis ANOVA y se estudian los intervalos LSD (Least Significant Differences).

3.4.1 Análisis estadístico de las medidas de intensidad de la señal

El análisis estadístico se realiza utilizando el programa informático SigmaPlot 11 y aplicando las recomendaciones indicadas por Romero y Zúnica (1993).

3.4.1.1 Análisis de Varianza (ANOVA)

En estadística, análisis de varianza (ANOVA, según terminología inglesa), es una colección de modelos estadísticos y sus procedimientos asociados.

El análisis de varianza sirve para comparar si los valores de un conjunto de datos numéricos son significativamente distintos a los valores de otro o más conjuntos de datos. El procedimiento para comparar estos valores está basado en la varianza global observada en los grupos de datos numéricos a comparar. Este método se utiliza para asociar una probabilidad a la conclusión de que la media de un grupo de puntuaciones es distinta de la media de otro grupo de puntuaciones.

Se trata de un análisis de varianza con un único factor, es decir, unifactorial. Se pretende comprobar que, cómo la variabilidad total existente entre los datos es debida al efecto del valor investigado (variabilidad debida entre tratamientos) y al efecto de los valores no controlados (variabilidad residual).

El modelo del ANOVA asume en principio que todas las poblaciones estudiadas tienen una misma varianza σ^2 .

La comparación entre ambas variabilidades se distribuye como una F de Fisher-Snédecor (con los grados de libertad correspondientes) si son ciertas las respectivas hipótesis nulas de que los efectos considerados son nulos. Por el contrario, un efecto no es nulo, si la correspondiente es un promedio mayor que una F de Fisher-Snédecor. La hipótesis nula se rechazará si la F_{ratio} (variabilidad residual), resulta mayor que el valor crítico $F(\alpha)$ que se obtiene en tablas para un riesgo de 1ª especie α predeterminado. En estas condiciones:

- Si $F_{\text{ratio}} \leq F_{\alpha; k-1; N-k}$ se acepta la hipótesis.
- Si $F_{\text{ratio}} > F_{\alpha; k-1; N-k}$ se rechaza la hipótesis.

Normalmente se opera con un valor de α igual al 0,05.

3.4.1.2 Intervalos LSD

Cuando el efecto de un factor cualitativo con más de dos niveles resulta significativo es necesario continuar el análisis con el fin de precisar la naturaleza de dicho efecto. Una forma de analizar la significación de las diferencias entre las medias correspondientes de las variantes de un factor es construir intervalos LSD para cada media.

Obtenidos los intervalos LSD la diferencia entre dos variantes se considera significativa si sus respectivos intervalos no se solapan, y no significativa en el caso que se solapen.

3.5 Identificación y recuento de protozoos

Como parte de la tesis y junto con un estudio más detallado de los protozoos que se realiza en paralelo en el laboratorio del IIAMA, se realizó la identificación y recuento de los protozoos en las muestras de estudio.

El análisis microscópico para llevar a cabo la identificación y conteo de estos organismos se realizó en un intervalo de tiempo máximo de 24 horas después de la toma de muestras. Las observaciones se realizaron en un microscopio de contraste de fases Zeiss (modelo Axiostar). La estimación de la densidad de protistas y metazoos se llevó a cabo por recuento directo de dos alícuotas de 25 μL (Madoni, 1988); para el recuento de ciliados sésiles coloniales se realizaron cuatro réplicas adicionales. Su abundancia se expresó como ind/mg SSLM.

Para la estimación de la densidad de pequeños flagelados se examinaron dos réplicas, tomando un volumen de 25 μL , en la diagonal de la cámara Fuchs Rosenthal (Madoni, 1988). Los organismos fueron identificados in vivo usando las claves de Foissner *et al.* (1991; 1992; 1994; 1995; 1996), Rodríguez *et al.*, (2008) y Serrano *et al.*, (2008). Cuando fue necesario se utilizó para la identificación la técnica de impregnación argéntica (Fernández-Galiano 1976; 1994) y tinción con Flutax-2 (Arregui *et al.*, 2003). Se consideraron dos grupos de amebas desnudas según el tamaño celular; amebas grandes ($>50 \mu\text{m}$) y pequeñas ($<50 \mu\text{m}$).

3.6 Protocolo de determinación de la actividad enzimática

Se han puesto a punto las técnicas para el análisis de las siguientes actividades enzimáticas en las formas de media luna:

- fosfatasa
- glucuronidasa

Se realizarón diferentes ensayos para el análisis de las actividades enzimáticas de las formas elipsoidales. Se ha optado por combinar el análisis de la actividad enzimática con la tinción de Neisser y microscopía de contraste de fases. Los sustratos exoenzimáticos utilizados son ELF-FOS y ELF-GLU.

3.6.1 Fijación formas media luna para determinar la actividad Fosfatasa

- Añadir a 1 ml de licor mezcla 5µl de solución 4mM de ELF-FOS y mantener a temperatura ambiente y en oscuridad durante 1 hora.
- Concentrar las células mediante centrifugación (7000 r.p.m durante 1 minuto) y eliminar el sobrenadante.
- Resuspender en PBS 1X (250µl) y 750µl de PFA y mantenerlo a 4°C durante una hora.
- Concentrar las células mediante centrifugación (7000 r.p.m durante 1 minuto) y eliminar el sobrenadante.
- Resuspender en 500µl de PBS 1X.
- Concentrar las células mediante centrifugación (7000 r.p.m durante 1 minuto) y eliminar el sobrenadante.
- Resuspender finalmente en 1000µl de PBS 1X.

3.6.2 Fijación formas media luna para determinar la actividad Glucuronidasa

- Añadir a 1 ml de licor mezcla 2.5µl de solución 4mM de ELF-GLU y mantener a temperatura ambiente y en oscuridad durante 1 hora
- Concentrar las células mediante centrifugación (7000 r.p.m durante 1 minuto) y eliminar el sobrenadante
- Resuspender en PBS 1X (250 µl) y 750 µl de PFA y mantenerlo a 4°C durante una hora
- Concentrar las células mediante centrifugación (7000 r.p.m durante 1 minuto) y eliminar el sobrenadante
- Resuspender en 500µl de PBS 1X
- Concentrar las células mediante centrifugación (7000 r.p.m durante 1 minuto) y eliminar el sobrenadante
- Resuspender finalmente en 1000µl de PBS 1X.

3.6.3 Tinción Neisser (Eikelboom y van Buijsen, 1981)

Reactivos

- Solución I: 2 A+ B (Mezclar 2 partes de la solución A y una parte de B (v/v))
 - A: 0,1 g de Azul de metileno + 5 mL de etanol 95% + 5 mL de ácido acético glacial + 100 mL de agua destilada.
 - B: 3,3 mL de Cristal violeta al 10% en etanol al 95% + 6,7 mL etanol 95% + 100 mL de agua destilada.
- Solución II: 33,3 mL de Marrón Bismarck (Crisoidina) al 1% en solución acuosa + 66,7 mL de agua destilada.
- Portaobjetos
- Líquido de montaje
- Aceite de inmersión

Procedimiento

1. Teñir el frotis con la solución I durante 30 segundos.
2. Lavar con agua destilada durante unos segundos.
3. Teñir durante 1 minuto con solución II.
4. Aclarar con agua destilada.

3.6.4 Observación al microscopio

Una vez desarrollado todo el procedimiento, las muestras están preparadas para ser observadas al microscopio. Para el montaje se utiliza líquido de montaje y se coloca el cubreobjetos para su observación. El objetivo necesario para la correcta observación es el de 100 aumentos por lo que es necesario el uso de aceite de inmersión para evitar la dispersión de los rayos de luz. El filtro de luz para observar la señal de la actividad enzimática es el de epifluorescencia.

El microscopio utilizado para la observación de las muestras es un Olympus BX50. Las fotografías han sido tomadas con una cámara digital Olimpos DP10 acoplada al microscopio con los filtros: U-MWIB (Fluoresceína, FAM) y U-MWIG (Rodamina, TAMRA).

3.6.5 Doble tinción para gránulos intracelulares de polifosfato (Poli P) y polihidroxibutirato (PHB)

Reactivos

Solución 1:

- Solución acuosa de azul de Nilo A 1% (p/v), filtrada antes de usar.

Solución 2:

- Ácido acético al 8% (v/v)

Solución 3:

Azul de metileno (tinción de Neisser)

- 0,1 g de azul de metileno
- 5 ml de ácido acético glacial
- 5 ml de etanol al 95%
- 100 ml de agua destilada

Solución 4:

Lugol (tinción de Gram)

- 3g de ioduro potásico
- 1 g de iodo
- 300 ml de agua destilada

Procedimiento

1. Poner unos 20 microlitros de muestra (1 gota aprox.) en el porta y extenderla sobre una superficie aproximada a la del cubre. Dejarla secar al aire. Fijar con calor.
2. Aplicar la solución 1 durante 10 min a 55°C
3. Verter el exceso de colorante, lavar con la solución 2 durante 1 min.
4. Teñir con la solución 3 durante 1 min.
5. Lavar con la solución de lugol.
6. Poner líquido de montaje y cubrir con un cubre.
7. Examinar a 1000x (con aceite de inmersión sin fluorescencia) con el microscopio de epifluorescencia, filtro de excitación BP546/10, filtro de emisión LP590 y espejo dicróico 580. Los gránulos de poli P se observan con microscopía de campo claro.

Para la identificación de los gránulos se basa en los colores de tinción que resulta después del tratamiento antes descrito:

- Gránulos de PHB: Gránulos intracelulares fluorescentes de color rojo-naranja.
- Gránulos de Poli P: Gránulos intracelulares fluorescentes de color azul oscuro.

3.7 Análisis estadístico

Los datos de los parámetros operacionales físicos, químicos del licor mezcla, y biológicos fueron obtenidos de un estudio llevado a cabo en los laboratorios de química y microbiología del agua del IIAMA en conjunto con la EPSAR.

Los datos proporcionados se detallan en las tablas 12, 13, 14 y 15.

Tabla 12. Datos operacionales de la línea 1

Muestra	Q (m ³ /d)	OD (mg/L)	TRH (h)	Temp (C°)	Cm (Kg DBO5/ Kg SSVLM.d)	EF (día)
10-Diciembre	17054	1,99	5,9	16,6	0,36	4,20
23-Diciembre	14970	2,00	6,7	16,8	0,44	3,90
07-Enero	15756	2,02	6,4	15,7	0,4	3,90
21-Enero	14851	2,00	6,8	17,2	0,4	3,80
04-Febrero	14964	1,97	6,7	16,4	0,49	3,20
18-Febrero	14687	2,00	6,9	17,2	0,33	3,60
04-Marzo	15379	1,73	6,6	18,0	0,36	3,20
01-Abril	19454	1,83	5,3	15,0	0,51	2,80
29-Abril	16631	1,96	6,1	20,0	0,46	4,80
13-Mayo	14859	1,91	6,8	21,7	0,25	5,30
27-Mayo	15273	1,99	6,6	23,2	0,22	5,10
10-Junio	15106	1,98	6,7	23,2	0,41	6,40
24-Junio	16929	1,99	6,0	23,2	0,48	6,20
08-Julio	15071	2,00	6,7	26,3	0,4	5,50
22-Julio	15638	2,01	6,5	26,6	0,4	6,10
16-Septiembre	16362	2,01	6,2	25,0	0,16	11,50
30-Septiembre	17120	2,01	5,9	22,0	0,1	13,10
14-October	15370	2,01	6,5	23,4	0,19	13,40
27-October	15539	2,01	6,5	22,0	0,22	5,50
11-Noviembre	15815	2,01	6,4	20,1	0,17	21,40
25-Noviembre	15462	2,01	6,5	20,2	0,24	8,00
21-Diciembre	15400	2,01	6,5	16,8	0,36	5,10

Tabla 13. Datos operacionales de la línea 2

Muestra	Q (m³/d)	OD (mg/L)	TRH (h)	Temp (C°)	Cm (Kg DBO5/ Kg SSVLM.d)	EF (día)
10-Diciembre	25580	1,84	5,9	16,6	0,27	4,75
23-Diciembre	22470	1,92	6,7	17,0	0,4	3,69
07-Enero	23634	1,81	6,4	15,6	0,41	3,81
21-Enero	22277	1,85	6,8	17,2	0,38	3,80
04-Febrero	22446	1,75	6,7	16,4	0,61	2,73
18-Febrero	22031	1,97	6,8	17,2	0,47	2,73
04-Marzo	23068	1,78	6,6	17,9	0,43	2,71
01-Abril	29181	1,71	5,3	15,0	0,38	3,05
29-Abril	24946	1,73	6,1	20,4	0,41	5,17
13-Mayo	22288	1,60	6,8	21,6	0,35	3,74
27-Mayo	22910	1,49	6,6	23,0	0,2	4,21
10-Junio	22659	1,63	6,7	25,0	0,45	5,82
24-Junio	25393	1,57	6,0	24,8	0,30	8,19
08-Julio	22607	1,48	6,7	26,2	0,35	7,20
22-Julio	23458	1,91	6,4	25,9	0,38	6,68
16-Septiembre	24543	1,48	6,1	24,7	0,19	8,84
30-Septiembre	25680	1,70	5,9	22,1	0,14	10,23
14-October	23056	1,72	6,5	23,2	0,14	15,77
27-October	23309	1,74	6,5	22,0	0,20	6,13
11-Noviembre	23723	1,22	6,4	20,2	0,15	21,90
25-Noviembre	23192	1,91	6,5	20,3	0,38	5,52
21-Diciembre	23101	1,76	6,5	16,6	0,31	4,80

Tabla 14. Datos Físico-químicos de la línea 1

Muestra	pH	Cond	NT (mg/L)	PT (mg/L)	DQOT (mg/L)	SSV (mg/L)
10-Diciembre	7,73	1600	186	34	2165	1474,75
23-Diciembre	7,22	1950	200	42	2490	1717,70
07-Enero	7,65	1950	222	51	2310	1530,90
21-Enero	7,10	946	144	42	1702	1264,00
04-Febrero	7,32	1720	100	23	1326	902,00
18-Febrero	7,56	1580	140	29	1674	1326,00
04-Marzo	7,88	1699	106	34	1780	1302,00
01-Abril	7,55	1676	87	21	1307	922,50
29-Abril	7,34	1536	154	43	2418	1786,40
13-Mayo	7,32	1477	154	37	2170	1701,70
27-Mayo	7,50	2540	196	47	3116	2365,00
10-Junio	7,56	1580	164	38	2260	1504,50
24-Junio	7,40	1990	224	49	2702	1814,60
08-Julio	7,64	2040	196	41	1956	1294,80
22-Julio	7,08	984	172	46	1900	1121,80
16-Septiembre	7,45	1720	152	39	2132	1411,20
30-Septiembre	7,54	1579	144	32	1720	1348,20
14-October	7,52	1709	158	41	2420	1797,60
27-October	7,51	1680	88	22	1266	900,00
11-Noviembre	7,32	1050	130	45	2480	1737,40
25-Noviembre	7,45	1463	138	42	2064	1568,70
21-Diciembre	7,65	1690	144	34	2086	1509,45

Tabla 15. Datos Físico-químicos de la línea 2

Muestra	pH	Cond	NT (mg/L)	PT (mg/L)	DQOT (mg/L)	SSV (mg/L)
10-Diciembre	7,55	2040	258	48	2530	1757,40
23-Diciembre	7,33	2050	254	62	3240	2068,00
07-Enero	7,00	1794	226	55	2104	1384,60
21-Enero	7,34	1261	126	34	1632	1103,90
04-Febrero	7,32	1506	164	39	2146	1581,00
18-Febrero	7,56	1760	110	37	1806	1445,00
04-Marzo	7,50	1314	92	24	1464	947,10
01-Abril	7,33	1348	176	62	2864	2020,20
29-Abril	7,31	1012	178	54	3122	2086,00
13-Mayo	7,60	1480	214	50	3308	2402,40
27-Mayo	7,48	1700	178	38	2374	1755,25
10-Junio	7,36	1990	244	46	2772	1944,80
24-Junio	7,37	2150	264	62	3078	2096,70
08-Julio	7,30	1930	208	52	2052	1436,50
22-Julio	7,51	1327	110	28	1272	928,80
16-Septiembre	7,43	1561	134	26	1404	1074,45
30-Septiembre	7,50	1740	98	31	1590	1341,60
14-October	7,38	1328	110	33	1802	1147,50
27-October	7,38	1300	140	45	2254	1620,00
11-Noviembre	7,25	1506	160	58	2760	1965,00
25-Noviembre	7,76	1476	204	59	3310	2299,10
21-Diciembre	7,55	1710	170	35	2196	1589,45

Con los datos proporcionados y los resultados de las abundancias de las bacterias y arqueas previamente obtenidas se realizó el análisis estadístico de la siguiente manera:

- El primer paso es comprobar si las dos líneas de tratamiento pueden analizarse como una sola muestra. Para esto se realiza la prueba de Mann-Whitney que se basa en comprobar si dos muestras proceden de una misma población.
- Como segundo paso se realiza la prueba de normalidad. Para este paso se realiza el estadístico de Kolmogorov-Smirnov que es una prueba de significación que permite contrastar la hipótesis de que las muestras proceden de poblaciones normales.
- El tercer paso es conocer si hay o no una asociación lineal entre las variables. Para saber si existe una relación lineal entre dos variables se realizan correlaciones. La correlación mide la relación lineal entre dos variables y su sentido (si es directo o inverso). Cuando la relación es

perfectamente lineal dicho coeficiente vale 1 (o -1). Cuando el coeficiente tiene un valor próximo a cero, o bien no existe relación entre las variables analizadas o dicha relación no es lineal.

En el caso paramétrico, la medida usual de correlación es el coeficiente de correlación r de Pearson. Esta estadística requiere datos que representen medidas por lo menos en una escala de intervalos iguales. Si deseamos probar la significación de un valor observado de r , debemos no solamente satisfacer el requisito de medida, si no también suponer que los datos son de una población normal (Siegal, 1983).

Si dado un conjunto de datos no satisface el requisito de medida de r o la suposición de normalidad, esta no es realista, por lo tanto se hace uso de coeficientes de correlación no paramétricos, como es el caso del coeficiente de correlación de rango de Spearman.

En ambas correlaciones cada coeficiente obtenido se le realiza el siguiente contraste de hipótesis para determinar si el coeficiente es igual a cero:

$$H_0: \rho = 0$$

$$H_1: \rho \neq 0$$

- Una vez conocidas las correlaciones se realiza un análisis simultáneo de las variables. Para este paso se hace uso de los análisis multivariantes.

El primer análisis que se realiza es correlaciones canónicas (CCorA). Este es adecuado cuando se dispone de información de un conjunto numeroso de variables que pueden agruparse en dos grupos, el primero formado por las variables explicativas y el segundo por las explicadas y, además, dentro de cada grupo se observa un elevado grado de correlación entre las variables (Badii *et al.*, 2007). Es decir, CCorA busca la relación entre dos grupos de variables.

Se expresa la forma general del análisis canónico como:

$$Y_1 + Y_2 + Y_3 + \dots + Y_n = X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n$$

De forma general, el análisis de correlación canónico se basa en el supuesto de linealidad. El supuesto de linealidad influye en dos aspectos en la correlación canónica, primero porque el coeficiente de correlación entre cualquiera de dos variables está basado en una relación lineal. Segundo, la correlación canónica es la relación lineal entre los valores teóricos. Si los valores teóricos se relacionan de una manera no lineal, la relación no será reflejada por la correlación canónica. Por este

motivo antes de aplicar esta técnica es preciso conocer la asociación lineal de las variables, es decir los coeficientes de correlación de Pearson y Spearman.

También se realizó un análisis de correspondencia (AC). Esta técnica es de interdependencia entre las variables de una tabla de contingencia la cual tiene la capacidad de acomodar datos no métricos o métricos así como relaciones lineales y no lineales, por lo que destaca entre otras técnicas de interdependencia (Greenacre Michael, 2008). El AC tiene una relativa libertad entre los supuestos básicos comparado con otras técnicas multivariantes (Hair *et al.*, 1999).

El AC nos permite visualizar tablas de datos en subespacios de baja dimensionalidad que explican de forma óptima la inercia. Mediante puntos adicionales (que no tiene efecto alguno sobre la solución hallada) podemos visualizar información externa suplementaria de filas o de columnas.

Otro estadístico multivariante aplicado es análisis de correspondencia canónica (ACC). Esta es una técnica multivariante que permite representar en un espacio geométrico de pocas dimensiones las proximidades existentes entre un conjunto de objetos, el cual está condicionado por una serie de variables predictoras. El ACC es una técnica de ordenación restringida, lo que significa que la ordenación de los objetos representa solamente la estructura de los datos que maximiza la relación con una segunda matriz de variables predictoras (Greenacre Michael, 2008). Normalmente el ACC relaciona dos matrices: la matriz de variables dependientes (una matriz de sitios x especies) y la matriz de variables independientes (una matriz de variables ambientales). La relación entre ambas matrices se hace por medio de técnicas de regresión multivariante, es decir, es una extensión del Análisis de correspondencia (AC) en el que los ejes de ordenación se eligen en función de las variables ambientales conocidas, imponiendo la restricción adicional de que los ejes deben ser combinaciones lineales de las variables ambientales (Greenacre Michael, 2008). De este modo la variación de la comunidad se relaciona directamente con la variable ambiental.

Este análisis permite al investigador conocer la relación de la abundancia microbiana con las variables del entorno.

En el uso de estas técnicas se basa en la medida de la inercia, la inercia es una medida de la varianza total de la tabla de contingencia independiente de su tamaño. Es decir, mide el grado total de dependencia existente entre las variables (Greenacre Michael, 2008). La fórmula de cálculo es:

$$inercia = \frac{\chi^2}{n}$$

Donde:

χ^2 es el estadístico *ji cuadrado*

n es el total de elementos

La distancia ji cuadrado que se representa como χ^2 , es una medida de dispersión de los datos, que se basa en la observación de las frecuencias observadas como esperadas (Greenacre Michael, 2008). En los análisis AC y ACC se utiliza para la prueba de independencia, que consiste en comprobar si dos características cualitativas están relacionadas entre sí, la fórmula de cálculo es:

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{Observada} - \text{esperada})^2}{\text{esperada}}$$

Todo el análisis estadístico de las técnicas multivariantes CCorA, AC y ACC se realizó con el *software* estadístico XLSTAT. 2013 (paquetes PRO y ADA).

Los gráficos de todos los resultados de abundancias se realizaron con el programa SigmaPlot 11.

Resultados

4 Resultados

En este capítulo se expondrán todos los resultados obtenidos con la técnica FISH divididos en 6 secciones. La primera sección comprende los resultados de las pruebas realizadas de permeabilización enzimática de las muestras. La segunda sección comprende los resultados de las hibridaciones FISH y la variación de la población del dominio arquea a lo largo del muestreo. La tercera sección corresponde al dominio bacteria, donde se detalla los resultados obtenidos en la hibridación FISH y la variación de la población a lo largo del muestreo. La cuarta sección engloba los resultados de las hibridaciones FISH y cuantificaciones de los grupos funcionales bacterianos estudiados. La quinta sección muestra todos los resultados del comportamiento poblacional de cada línea de la EDAR estudiada. Para finalizar la sexta sección presenta el estudio estadístico realizado con los datos operacionales, físico-químicos y biológicos (comunidades de protozoos).

4.1 Permeabilización enzimática de las muestras

En base a estudios (Roller *et al.*, 1994; Meier *et al.*, 1999; Serviour y Nielsen, 2010) con la técnica FISH de bacterias Gram positivas de los phylum *Firmicutes* y *Actinobacteria*, y arqueas *Crenarchaeota* (*Nitrosopumilus maritimus*), se realizaron pruebas de permeabilización enzimática con lisozima y mutanolisina para optimizar este paso en su detección y cuantificación.

El ensayo consistió en variar los tiempos de permeabilización y la temperatura en el tratamiento enzimático. En la tabla 16 se muestra los tiempos y las dos temperaturas de la prueba.

Para llevar a cabo la prueba se utilizó una muestra de la EDAR de la cuenca del Carraixet fijada como Gram positiva para las sondas de los phylum *Actinobacteria* y *Firmicutes*, como Gram negativa y Gram positiva para la sonda de la arquea *Nitrosopumilus maritimus*. El tiempo de hibridación se fijó en 1.5 h.

En la prueba de permeabilización enzimática se hizo uso de cepas control. Los controles usados se describen en la tabla 17. Para la arquea *Nitrosopumilus maritimus*, no se disponía de controles, por lo que se usó como control positivo una muestra del digestor anaerobio de la misma EDAR.

Tabla 16. Prueba de permeabilización enzimática

Tiempo permeabilización celular Organismo	10 min	15 min	20 min	30 min	40 min	
	<i>Actinobacteria</i>	Temp amb+L	Temp amb+L	Temp amb+L	Temp amb+L	Temp amb+L
<i>Firmicutes</i>	Temp amb/4° +L	Temp amb/4° +L	Temp amb/4° +L	Temp amb/4° +L	Temp amb/4° +L	Sin tratamiento
<i>Nitrosopumilus</i>	Temp amb+L /4°+M	Temp amb+L /4°+M	Temp amb+L /4°+M	Temp amb+L /4°+M	Temp amb+L /4°+M	Sin tratamiento
<i>Arqueas</i>	Temp amb+L /4°+M	Temp amb+L /4°+M	Temp amb+L /4°+M	Temp amb+L /4°+M	Temp amb+L /4°+M	Sin tratamiento

L, Lisozima

M, Mutanolisina

Tabla 17. Células control en la prueba de tratamiento enzimático

Phylum	Células Control
<i>Actinobacteria</i>	<i>Gordonia amarae</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Enterococcus faecalis CECT 481</i>

CECT, Colección Española de Cultivos Tipo.

Para las bacterias *Actinobacterias* (sonda HGC69mix) en todos los tiempos los resultados fueron positivos, sin embargo, las intensidades de las señales aumentaban conforme aumentábamos los tiempos de exposición a la enzima. El incremento se reflejó hasta los 20 min de pretratamiento con Lisozima, en los tiempos mayores la intensidad de señal fue bajando. Los promedios de la intensidad obtenida con el tratamiento enzimático son:

- 10 min de 147,2 intensidad;
- 15 min de 162,5 intensidad;
- 20 min **185,15** intensidad;
- 30 min 145,5 intensidad;
- 40 min 127,05 intensidad.

El análisis ANOVA dio de resultado que hay diferencia significativa entre los tiempos de exposición de las células a la enzima (Anexo 1). El tiempo de penetración de 20 min fue el que dio mejor intensidad de señal de las bacterias hibridadas. En la figura 38 se muestra dos imágenes: la figura 38A que pertenece a células hibridadas

sin tratamiento enzimático y la 38B que pertenece a bacterias hibridadas después de 20 min de tratamiento enzimático.

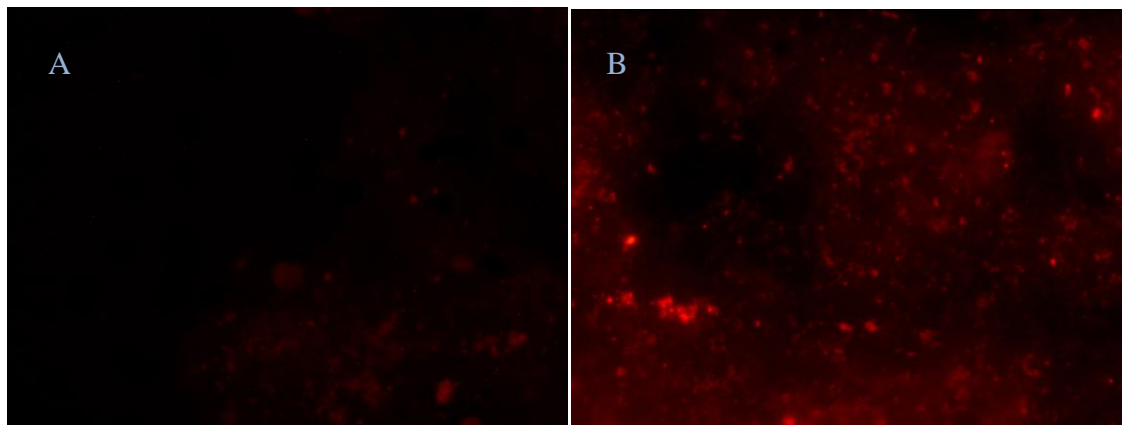


Figura 38. Actinobacterias hibridadas durante la prueba de tratamiento enzimático. En la figura A, Bacterias sin tratamiento enzimático. En la figura B, Bacterias con tratamiento enzimático de 20 min. 600X

Para las células de *Nitrosopumilus maritimus* (sonda Cren679) los promedios de las intensidades de señal de hibridación según análisis ANOVA presentan diferencia significativa. Los promedios de las intensidades de la señal hibridada tanto para Gram positiva como Gram negativa son:

- 10 min Gram positiva **156,05** intensidad
- 10 min Gram negativa 129,10 intensidad
- 15 min Gram positiva 137,45 intensidad
- 15 min Gram negativa **154,25** intensidad
- 20 min Gram positiva 133,60 intensidad
- 20 min Gram negativa 126,20 intensidad
- 30 min Gram positiva 132,30 intensidad
- 30 min Gram negativa 133,80 intensidad
- 40 min Gram positiva 142,95 intensidad
- 40 min Gram negativa 111,60 intensidad
- Sin Lisozima Gram negativa **140,90** intensidad

Las mejores intensidades se reportan con 10 min de tratamiento en células Gram positiva y 15 min de tratamiento en células Gram negativa. Según resultados del análisis estadístico por el método LDS no hay diferencia significativa entre estos resultados (Anexo 1). El segundo mejor resultado de intensidad de hibridación es a los 40 min en células Gram positiva y la hibridación sin tratamiento enzimático en células

Gram negativa. En base al método LDS entre estas dos intensidades no hay diferencia significativa.

La hibridación sin tratamiento enzimático presenta diferencia significativa entre el tratamiento de 10 min en células Gram positiva y 15 min de tratamiento en células Gram negativa.

En la prueba de tratamiento para las arqueas todas las hibridaciones con lisozima resultaron con señal de hibridación débil y no se resalta respecto a la señal de fondo.

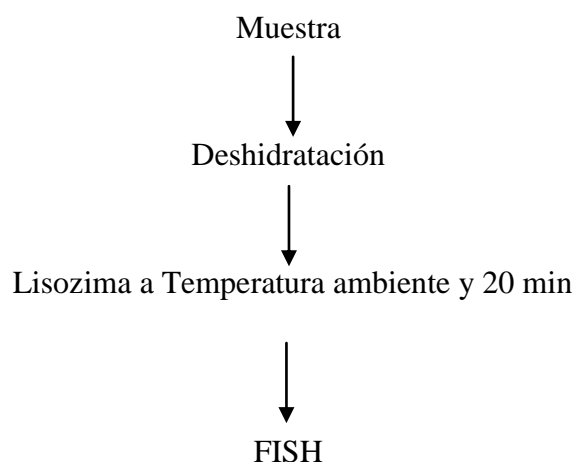
La mutanolisina resultó agresiva para la muestra. Con los 10 min de tratamiento con mutanolisina se vio células definidas, pero las intensidades de hibridación para las *Nitrosopumilus maritimus* fueron más bajas que las obtenidas con lisozima. Comparando los resultados de 10 min con mutanolisina en arqueas y en *Nitrosopumilus maritimus*, se obtuvo los siguientes resultados:

- Arqueas 100,85 intensidad en promedio
- *Nitrosopumilus* 120,15 intensidad en promedio

En la prueba de las *Firmicutes* fue muy complicada la observación de las células hibridadas. Las señales de hibridación resultaron muy débiles. Sin embargo, en la cepa control la hibridación fue positiva.

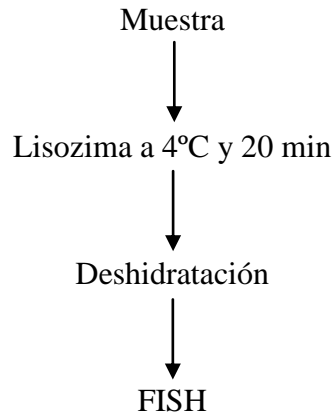
En base a la prueba de tratamiento enzimático se estableció el pretratamiento de las *Actinobacterias* como:

Para *Actinobacteria*



En el caso de las firmicutes según información previa y en vista de la mala visualización de las células en la prueba se estableció el siguiente pretratamiento:

Para *Firmicutes*



En base a que en las muestras de la EDAR del Carraixet no se observaron hibridaciones claras, se procedió a realizar una prueba con cepas control del phylum *Firmicutes*. Las cepas control para esta prueba se pueden observar en la tabla 18.

Tabla 18. Cepas control del phylum *Firmicutes*

Cepa Control
<i>Enterococcus faecalis</i> CECT 481
* <i>Bacillus sp.</i>
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 4032
<i>Stafilococcus aureus</i> CECT 240
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CECT 963
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CECT 963 (Fijado con PFA 1 min)

CECT, Colección Española de Cultivos Tipo

***Aislado en el laboratorio por secuenciación**

Los resultados obtenidos en la prueba de hibridación con las sondas del phylum *Firmicutes* (LGC354mix) se detallan en la tabla 19.

Tabla 19. Resultados hibridación cepas control *Firmicutes*

Organismos	Resultado FISH
<i>Enterococcus faecalis</i>	Positivo
<i>Bacillus sp.</i>	Negativo
<i>Listeria monocytogenes</i>	Negativo
<i>Stafilococcus aureus</i>	Negativo
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Positivo
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (Fijado con PFA 1 min)	Positivo

La especificidad de la sonda complica detectar la presencia de las firmicutes en las muestras. Otro inconveniente observado durante las hibridaciones con las muestras fijadas como Gram positivas con y sin tratamiento enzimático fue que no se hibridan todas las células del floculo con las sonda EUBmix. Esto impide poder hacer una cuantificación en base a toda la población de bacterias y arqueas del floculo.

Para poder evaluar el efecto en los resultados de las hibridaciones se realizó dos pruebas más. La primera consistió en probar la fijación en dos cultivos puros. Para ello se sembró en agar *Escherichia coli* (γ -Proteobacteria) y *Enterococcus faecalis* (Firmicutes).

La hibridación se realizó con pretratamiento enzimático previo y sin pretratamiento enzimático. Las sondas utilizadas en este ensayo han sido EUBmix más las sondas específicas LGC354mix y GAM42+ Competidora. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 20.

Tabla 20. Resultados prueba fijación cultivos puros + hibridación con y sin tratamiento enzimático

Muestra	Sonda específica	Lisozima	Observación (sonda EUBmix)
G+	LGC354mix	si	Solo se ve bacterias con forma de cocos (<i>Enterococcus</i>), señal ambos canales bien
G+	GAM42+Competidora	no	Solo se ve bacterias con forma bacilar (<i>Escherichia</i>), señal en ambos canales bien
*G+	LGC354mix	si	Solo se ve bacterias en forma de cocos (<i>Enterococcus</i>), señal en rojo tenue
*G+	GAM42+Competidora	no	Solo se ve bacterias con forma bacilar (<i>Escherichia</i>), señal en verde tenue
G-	LGC354mix	si	**Se ven bacterias cocos (<i>Enterococcus</i>) y bacilos (<i>Escherichia</i>), sin embargo no todos los cocos se ven hibridados, señal en rojo tenue
G-	GAM42+Competidora	no	Solo se ve bacterias en forma bacilar (<i>Escherichia</i>), señal en ambos canales bien

G- Gram negativa

G+ Gram positiva

***Fijación 1 hr PFA y con 9 min de pretratamiento enzimático (Thurnheer *et al.*, 2004)**

****Poca intensidad en la señal de hibridación con la sonda LGC354mix**

En base a los resultados de esta prueba se puede decir que la fijación para bacterias Gram negativas con tratamiento de permeabilización con lisozima es la mejor para la hibridación de bacterias Gram negativas y Gram positivas. Para evaluar la fijación Gram negativa con lisozima se llevó a cabo otra prueba adicional, que consistió en probar si el tratamiento enzimático resulta agresivo (lisa) o no para otras

Proteobacteria y otros phylum (*Bacteroidetes* y *Chloroflexi*) de bacterias las Gram negativas. Para llevar a cabo la siguiente prueba se usaron cepas control de diferentes phylum y clases del phylum *Proteobacteria* de bacterias. Las cepas utilizadas se observan en la tabla 21.

Tabla 21. Cepas control para prueba lisis celular por lisozima

Cepa Control	Phylum/Clase
<i>Rhizobium radiobacter</i> CECT 4112	α - <i>Proteobacteria</i>
<i>Caulobacter sp.</i> CECT 4640	α - <i>Proteobacteria</i>
<i>Brevundimonas intermedia</i> CECT 834T	α - <i>Proteobacteria</i>
<i>Rhodocyclus purpureus</i> CECT 5771	β - <i>Proteobacteria</i>
<i>Deftia acidovorans</i> CECT 311	β - <i>Proteobacteria</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i> CECT 145	β - <i>Proteobacteria</i>
<i>Achromobacter</i> CECT 449	β - <i>Proteobacteria</i>
<i>Burkholderia cepacia</i> CECT 322	β - <i>Proteobacteria</i>
<i>Escherichia coli</i> CECT 515	γ - <i>Proteobacteria</i>
<i>Salmonella entérica</i> CECT 881	γ - <i>Proteobacteria</i>
<i>Campylobacter coli</i> NCTC 1	ϵ - <i>Proteobacteria</i>
<i>Campylobacter coli</i> NCTC 2	ϵ - <i>Proteobacteria</i>
<i>Flavobacterium columnare</i> CECT 7587	<i>Bacteroidetes</i>
<i>Flavobacterium johnsoniae</i> CECT 5015	<i>Bacteroidetes</i>
<i>Herpetosiphon sp.</i> CECT 7211	<i>Chloroflexi</i>

CECT, Colección Española de Cultivos Tipo

NCTC, National Collection Type Culture

Las hibridaciones se hicieron con y sin lisozima para comprobar si la lisozima lisa o no la célula en el momento de la permeabilización.

Los resultados se indican en la tabla 22. Como se puede ver en la tabla 22, la lisozima afecta o lisa a algunas bacterias Gram negativas. Por lo que el uso de ella afecta al total de bacterias que se pueden detectar con la fijación de Gram negativa y posterior tratamiento con lisozima.

Tabla 22. Resultado de lisis celular por lisozima

Organismos	Con Lisozima	Sin Lisozima
<i>Rhizobium radiobacter</i>	Negativo	Positivo
<i>Caulobacter sp.</i>	Positivo	Positivo
<i>Brevundimonas intermedia</i>	*Negativo	Positivo
<i>Deftia acidovorans</i>	Positivo	Positivo
<i>Alcaligenes faecalis</i>	*Negativo	Positivo
<i>Achromobacter</i>	*Negativo	Positivo
<i>Burkholderia cepacia</i>	Positivo	Positivo
<i>Escherichia coli</i>	Positivo	Positivo
<i>Salmonella entérica</i>	Negativo	Positivo
<i>Campylobacter coli</i> cepa 1	*Negativo	Positivo
<i>Campylobacter coli</i> cepa 2	**Negativo	Positivo
<i>Flavobacterium columnare</i>	Negativo	Positivo
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	Positivo	Positivo
<i>Herpetosiphon sp.</i>	**Negativo	Positivo

***algunas bacterias hibridadas pero la gran mayoría no**

****La hibridación es de tan baja señal que se puede considerar negativo**

En base a estas pruebas los resultados en porcentajes de las poblaciones de bacterias Gram negativas y arqueas de los diferentes Phylum/Clases/Grupos funcionales hallados, se refieren a porcentajes en relación a las bacterias hibridadas por las sondas EUBmix + ARCH915 en muestras fijadas como Gram negativa sin tratamiento con lisozima para su permeabilización.

En base a todas las pruebas realizadas se decidió realizar las hibridaciones de las arqueas tanto de dominio como sus respectivos grupos sin tratamiento enzimático y con células fijadas como Gram negativa.

Para la realización de las hibridaciones y las posteriores cuantificaciones de cada población de bacterias y arqueas, se eliminaron muestras que presentaron inconvenientes en la hibridación. Tales inconvenientes fueron penetración nula de la sonda EUBmix o la sonda específica. Esto se puede deber a algún problema en el momento de fijación de las células. Las observaciones en el microscopio y las imágenes para la cuantificación se realizaron con el objetivo de 60x.

4.2 Identificación y variación de la población de Arqueas

Con la sonda ARCH915 se identificaron arqueas en todas las muestras de ambas líneas. En la figura 39 podemos ver la variación de la población de arqueas en cada línea del tratamiento biológico a lo largo del período muestreado. Se han unido los puntos experimentales para observar mejor las tendencias de la población de arqueas.

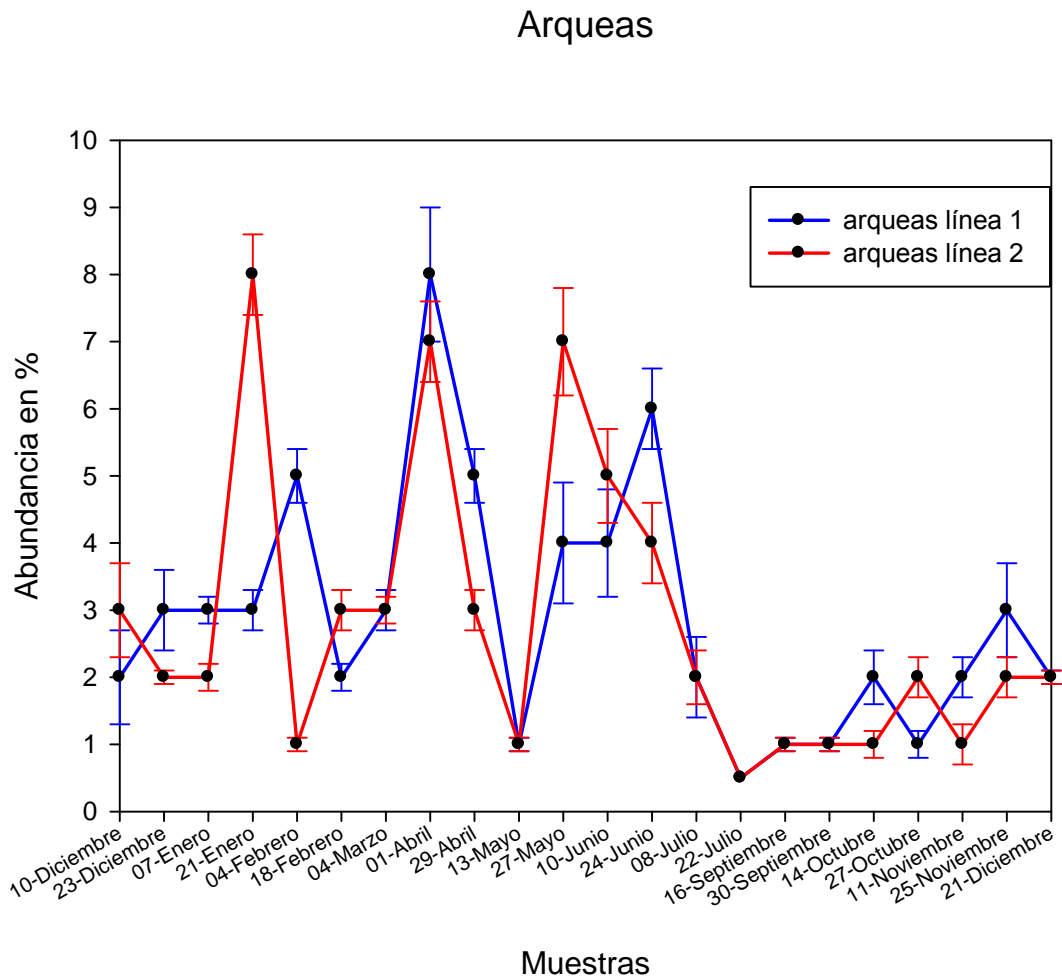


Figura39. Variación de la población de arqueas durante el muestreo.

En la figura 39 se puede ver que en la muestra 21 de enero se nota un incremento de ~6% en la línea 2. El incremento de la población en la línea 1 se observa en la muestra 4 de febrero con un ~2%, mientras en esa misma muestra en la línea 2, la población decrece un ~7%. En la muestra 18 de febrero en la línea 1 la población decrece un ~3% mientras que la línea 2 incrementa un ~2%. En la muestra 27 de mayo en ambas líneas incrementa la población, en la línea 2 con un ~6%, mientras que en la

línea 1 un ~3%. Observando la línea 1 entre las muestras 27 de mayo hasta la muestra 24 de junio la abundancia tiende a aumentar, mientras que en la línea 2 la abundancia tiende a disminuir. Entre las muestras 8 de junio hasta la muestra 21 de diciembre los comportamientos de la población entre las líneas son similares. Sin embargo en las muestras 14 de octubre, 27 de octubre y 11 de noviembre los comportamientos van de manera inversa entre líneas.

Considerando como el 100% la población de bacterias y arqueas hibridadas con EUBmix+ARCH915, la población de arqueas es menor del 10% de la población total encontrada en las muestras.

En la figura 40A se muestra la población de arqueas hibridadas con la sonda ARCH915 en rojo TAMRA, mientras que en la figura 40B se observa toda la población de bacterias y arqueas hibridadas con las sondas EUBmix+ARCH915 en verde FAM.

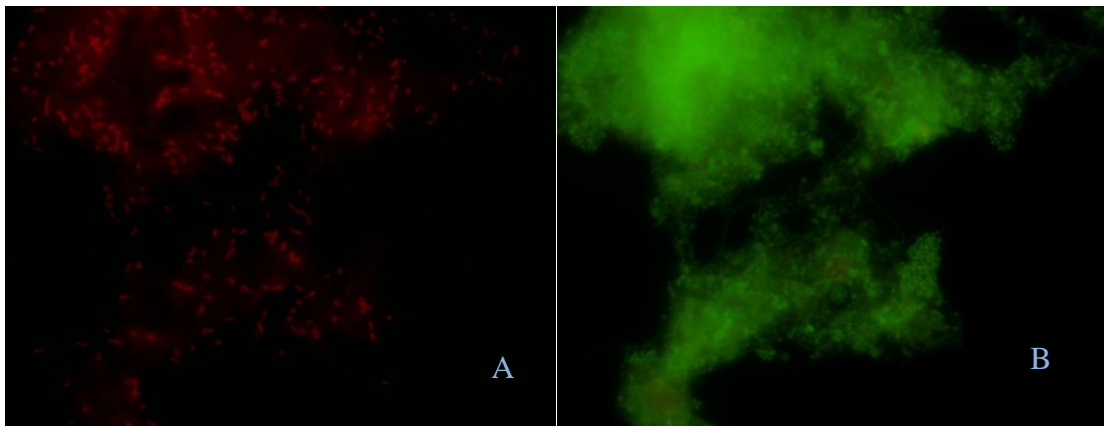


Figura40. Arqueas en fangos activos de la EDAR del Carraxet. En la Figura A sonda ARCH 915 en rojo TAMRA. En la Figura B sonda EUBmix+ARCH915 en verde FAM, 600X.

4.2.1 Identificación y cuantificación de los diversos grupos funcionales del dominio *Archaea*

Arqueas oxidadoras de amonio (AOA)

Dentro del dominio arquea se intentó establecer la abundancia de las arqueas oxidadoras de amonio (AOA) *Nitrosopumilus maritimus* (*Crenarchaeota*) con la sonda Cren679. Las AOA son células alargadas que forman pequeños filamentos y aglomerados. En todas las muestras se vieron células hibridadas. Sin embargo estas son células pequeñas y se encuentran muy internas en el floculo. Esto impidió obtener imágenes adecuadas y suficientes de las células para su cuantificación. El ruido de

fondo rojo no ha permitido cuantificar la población de AOA. En la figura 41 se puede ver estas arqueas y su distribución dentro del flóculo.

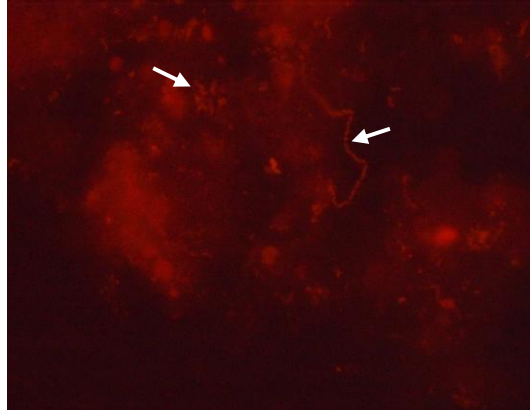


Figura41. Arqueas oxidadoras de amonio (AOA) *Nitrosopumilus maritimus* en fangos activos de la EDAR del Carraixet. Las células AOA se indican con flechas blancas para su mejor visualización, 1.000X

Arqueas metanogénicas

Otro grupo de arqueas que se encuentran en las muestras analizadas son bacterias metanogénicos del phylum *Euryarchaeota*. En la figura 42 se muestra la variación de las arqueas metanogénicas (*Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales* y *Methanobacterales*) durante el período del muestreo en la línea 1.

Arqueas metanogénicas en la línea 1

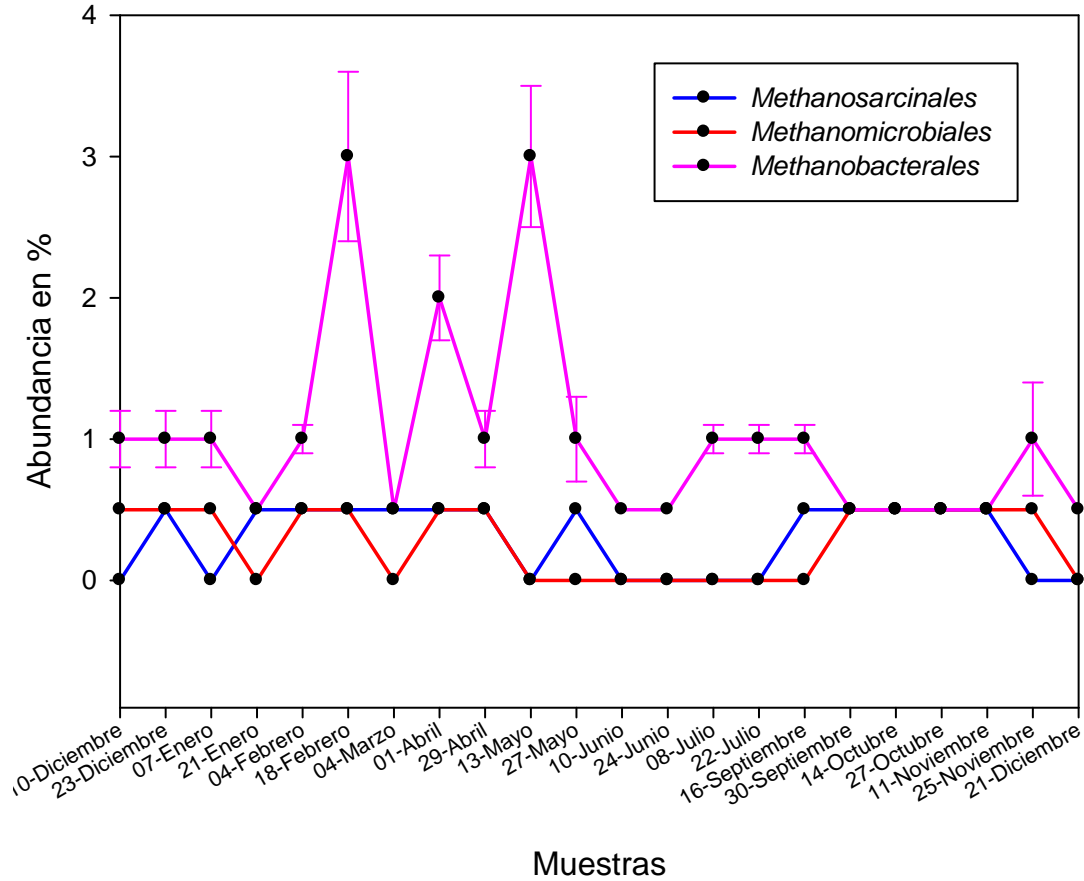


Figura42. Variación poblacional de las arqueas metanogénicas en la línea 1.

Al observar el gráfico de las metanogénicas en la línea 1 se puede ver que la población es muy escasa. Siendo las *Methanobacterales* el orden que más abundancia presenta.

Los órdenes de arqueas *Methanosarcinales* y *Methanomicrobiales* apenas hay presencia en algunas muestras. En la figura 43 se muestra la variación de las arqueas metanogénicas (*Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales* y *Methanobacterales*) en la línea 2. No se hallaron células de arqueas *Methanocaldococcaceae* y *Methanococcales* en ninguna de las líneas de los fangos activos de la EDAR. El comportamiento de las abundancias entre las líneas es muy similar.

Arqueas metanogénicas en la línea 2

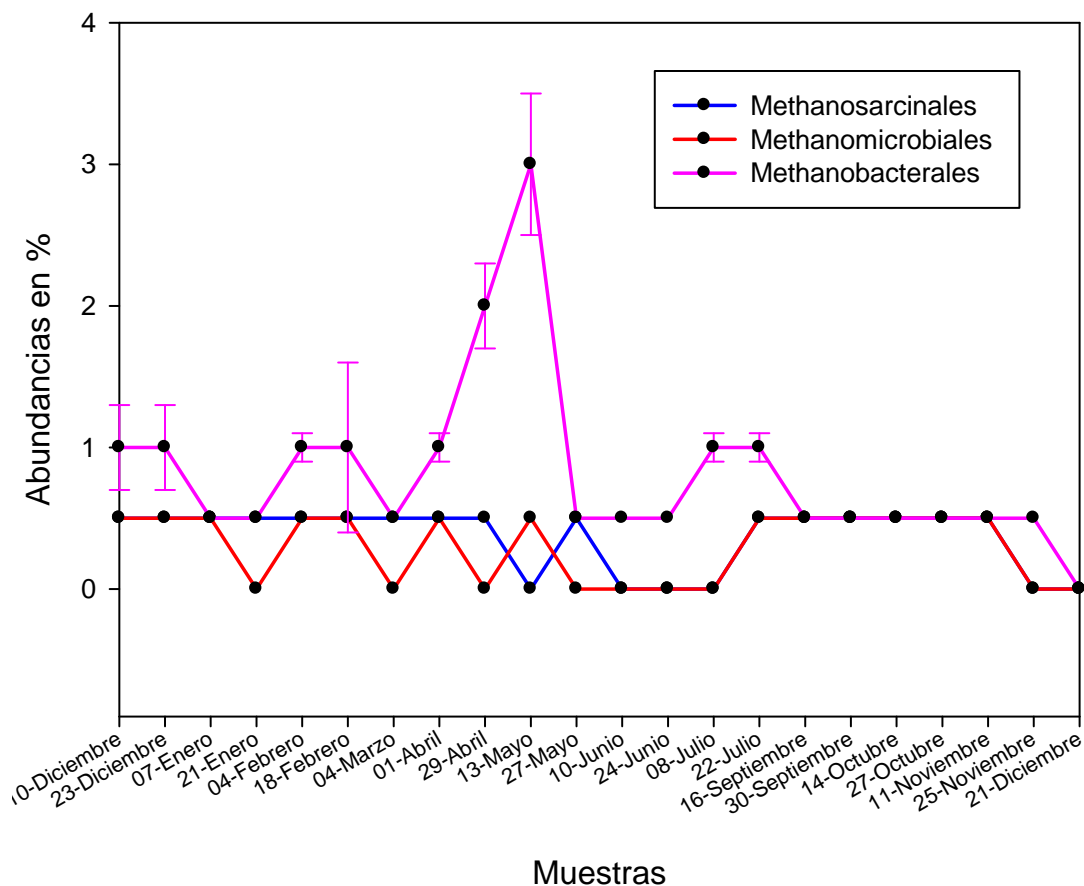


Figura 43. Variación poblacional de las arqueas metanogénicas durante el muestreo en la línea 2.

En la figura 44 podemos ver 4 campos de visualización de 4 muestras distintas con células de arqueas *Methanosarcinales*. Para facilitar la visualización de estas arqueas se ha utilizado. Las *Methanosarcinales* son arqueas que se hallan formando pequeños filamentos y algunos agregados.

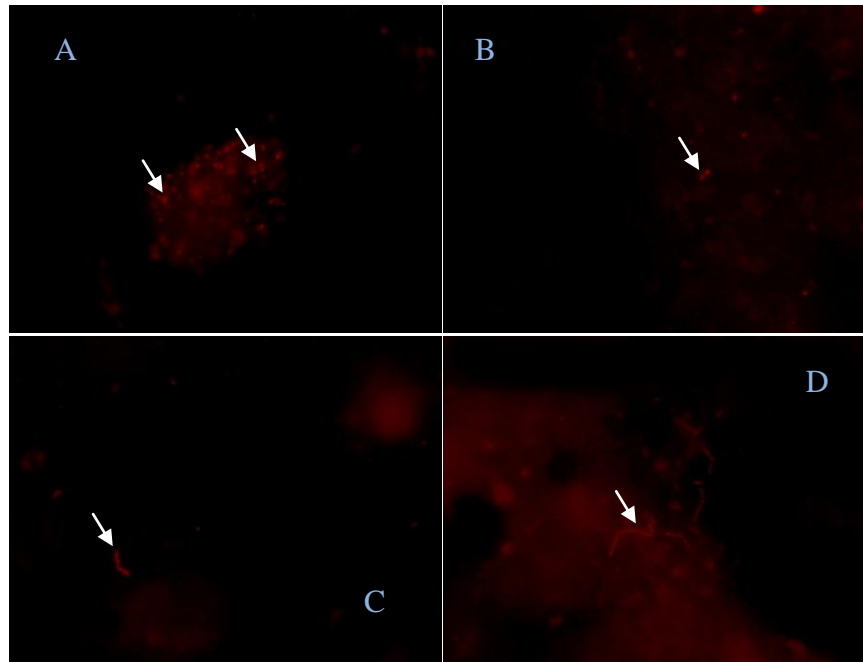


Figura 44. Arqueas *Methanosarcinales* en fangos activos de la EDAR del Carraixet. Figuras A y C corresponden a la línea 1. Figuras B y D corresponden a la línea 2. 600X.

En las hibridaciones de las *Methanomicrobiales* se observaron en algunas muestras uno o dos únicos flóculos con muchas de estas arqueas. En general, la presencia de las *Methanomicrobiales* no superaba el 1% de la población. En la figura 45 se pueden observar 4 campos distintos de visualización de distintas muestras, donde se pueden apreciar las morfologías de estas arqueas y su distribución espacial dentro del flóculo. Las células de arqueas *Methanomicrobiales* se indican con flechas blancas. En las figura 45A y 45B se pueden ver muestras donde hay presencia de flóculos grandes con muchas arqueas, mientras que en las figuras 45C y 45D se pueden observar pequeños flóculos dispersos en toda la muestra.

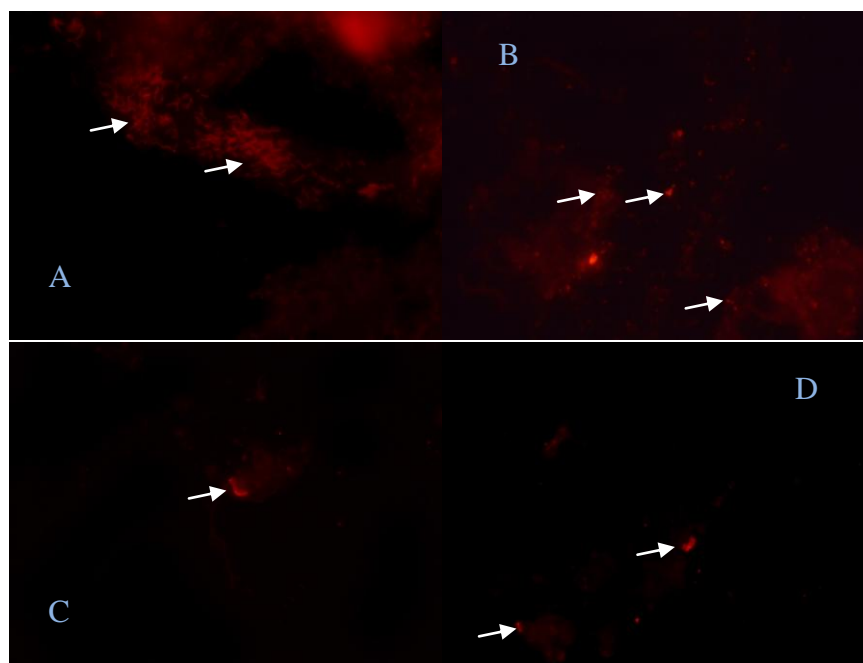


Figura 45. Arqueas *Methanomicrobiales* hibridadas con la sonda MG1200b en fangos activos de la EDAR del Carraixet. Figuras A y C corresponden a la línea 1. Figuras B y D corresponden a la línea 2. 600X.

Las *Methanobacterales* son la población de arqueas metanogénicas que más abundan en las muestras analizadas. Estas arqueas se pueden observar en la figura 46.

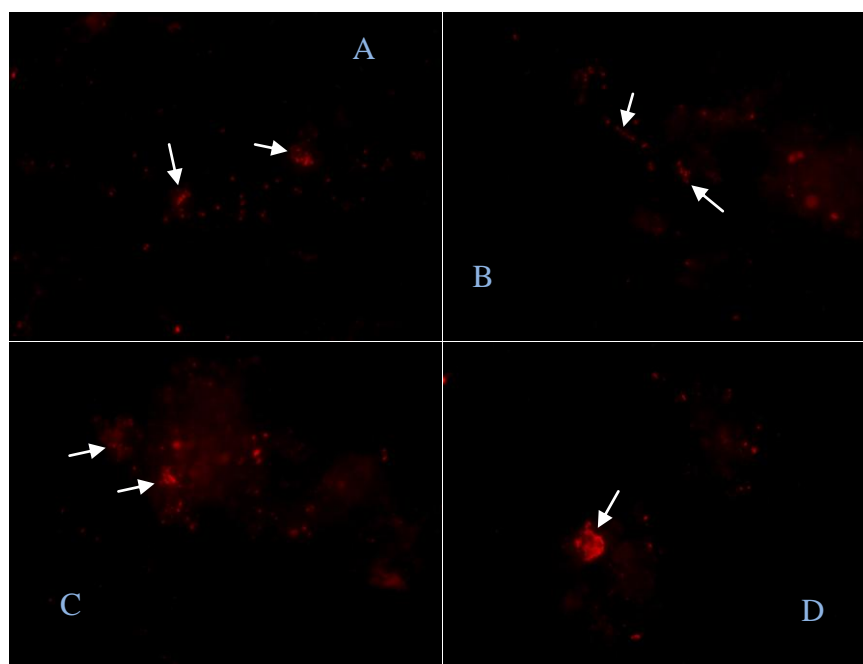


Figura 46. Arqueas *Methanobacterales* hibridadas con la sonda MB311 en fangos activos de la EDAR del Carraixet. Figuras A y C corresponden a la línea 1. Figuras B y D corresponden a la línea 2. 600X.

Las arqueas *methanobacterales* las encontramos como células dispersas y formando flóculos pequeños entre ellas. En la figura 46 se indican las arqueas con flechas en blanco para su mejor visualización.

En vista de los resultados de las abundancias de las arqueas metanogénicas se puede decir que la mayoría de las arqueas presentes en las muestras no pertenecen a las arqueas metanogénicas (phylum *Euryarchaeota*). *Nitrosopumilus maritimus* (AOA) no pudo ser cuantificada con la técnica FISH en las muestras analizadas debido a que éstas arqueas se encuentran adentradas en el floculo. Sin embargo cuando las muestras son observadas en el objetivo de 100x, se puede ver que la población de AOA es más abundante a comparación de las arqueas metanogénicas (superior al 3 %).

4.3 Identificación y variación de la población de Bacterias

En las hibridaciones para la identificación de los distintos phyla del dominio *Bacteria* se utilizaron las cepas control que se indican en la tabla 23.

Tabla 23. Cepas control de bacterias

Phylum	Cepa control
<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Rhizobium radiobacter</i> CECT4112
<i>β-Proteobacteria</i>	<i>Achromobacter</i> CECT449
<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Escherichia coli</i> CECT515
* <i>ε-Proteobacteria</i>	<i>Campylobacter coli</i> NCTC2
<i>Bacteroides</i>	<i>Flavobacterium columnare</i> CECT7587
<i>Chloroflexi</i>	<i>Herpetosiphon sp.</i> CECT7211
<i>Actinobacteria</i>	<i>Gorgonia amarae</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> CECT481

CECT, Colección Española de Cultivos Tipo

NCTC, National Collection of Type Cultures

A pesar de los problemas para la cuantificación de las Bacterias Gram positiva *Firmicutes* y *Actinobacteria*, se realizaron las hibridaciones correspondientes con las muestras fijadas para Gram positiva, con el fin de determinar la presencia de estas bacterias en las muestras objeto del estudio y observar la abundancia presente sin llegar a cuantificarla.

Las bacterias *Firmicutes* se observaron con el objetivo de 100x (figura 47). Las señales de hibridación de las bacterias *Firmicutes* fueron débiles y las células se localizaban en el interior del flóculo.

Las células identificadas dentro de este phylum con la sonda LGC354mix aparecen como filamentos finos y cortos como el que se puede ver en la figura 47 como células bacilares.

Las abundancias han sido inferiores al 1% de la población en todas las muestras de estudio. Todo esto considerando que el uso en conjunto de las sondas para este phylum solo llega a hibridar el 45% del phylum.

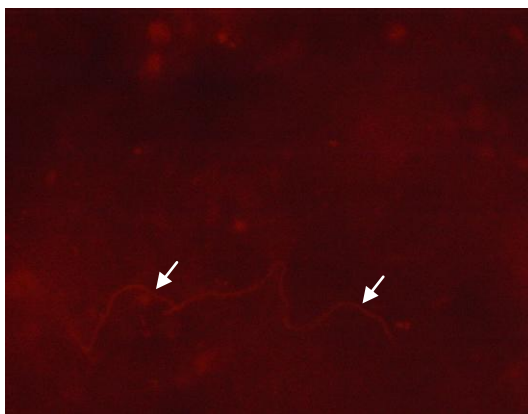


Figura 47. *Firmicutes* presentes en las muestras de la EDAR del Carraixet. Sonda LGC354mix+ competidoras. 1.000X.

En la figura 48 se pueden observar las *Actinobacterias* presentes en las muestras estudiadas. Estas bacterias forman agregados entre ellas, pero también se les puede ver dispersas en el flóculo.

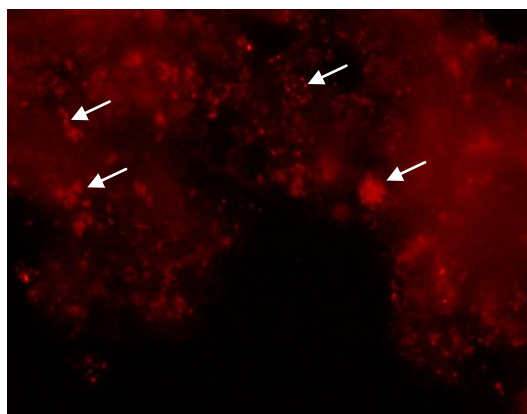


Figura48. *Actinobacterias* presentes en la muestras de la EDAR del Carraixet. Sonda HGC69 + competidora. 600X.

Como se puede observar en la figura 48 la población de *Actinobacterias* es abundante en el flóculo. Sin embargo la cuantificación no se realizó porque las señales en verde correspondían solo a las bacterias Gram positiva hibridadas con EUBmix+ARCH915. En todas las muestras analizadas las hibridaciones de este phylum bacteriano son positivos y con abundancias altas aunque sin cuantificar por análisis de imagen.

En dos phylum de bacterias Gram negativa no fue posible cuantificar por análisis de imagen, una de estas poblaciones corresponde al phylum *Bacteroidetes*. Las hibridaciones resultantes presentan una señal débil en las células hibridadas localizadas en el interior del flóculo. En la figura 49 podemos ver bacterias del phylum *Bacteroidetes* encontradas en las muestras de este estudio. Se observó en todas las muestras analizadas señal positiva con la sonda de este phylum, sin embargo sus abundancias han sido bajas.

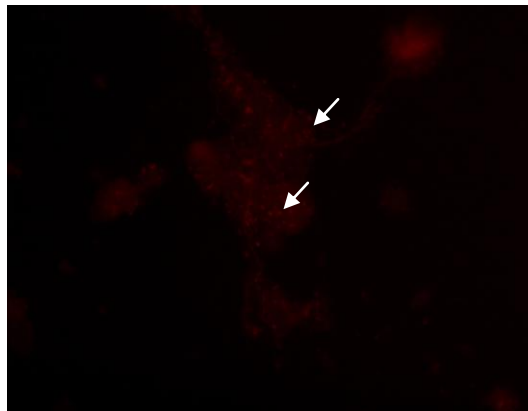


Figura49. Células del phylum *Bacteroidetes* en las muestras de la EDAR del Carraixet. Hibridadas con la sonda CF319b. 600X.

Otro phylum no cuantificado con el análisis de imagen es *Acidobacteria*. Las células hibridadas son difíciles de distinguir porque aparecen como células finas que se aglomeran entre ellas y con muy poca abundancia. En la figura 50 se pueden observar algunas células de este phylum presentes en las muestras estudiadas. De manera subjetiva se puede decir que la población de este phylum no llega a superar el 1% de la población, aunque se observaron células hibridadas en todas las muestras estudiadas.

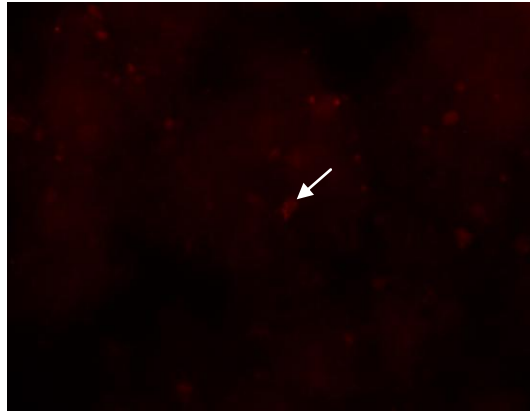


Figura50. *Acidobacterias* presentes en las muestras de la EDAR del Carraixet hibridadas con la sonda SS_HOL1400. 600X.

A continuación se detallan los resultados de las poblaciones de bacterias Gram negativa cuantificadas en las muestras analizadas.

Phylum *Chloroflexi*

Para las hibridaciones de las bacterias del phylum *Chloroflexi* se usaron las sondas CFX1223 y GNSB941 en conjunto. En todas las muestras fueron halladas éstas bacterias. En la figura 51 se puede ver la variación a través del tiempo del muestreo de las bacterias *Chloroflexi*. La variación de la población de *Chloroflexi* en ambas líneas es muy similar, aunque podemos observar en la figura 51, que en general las variaciones de la población se producían primero en la línea 2 y después en la 1.

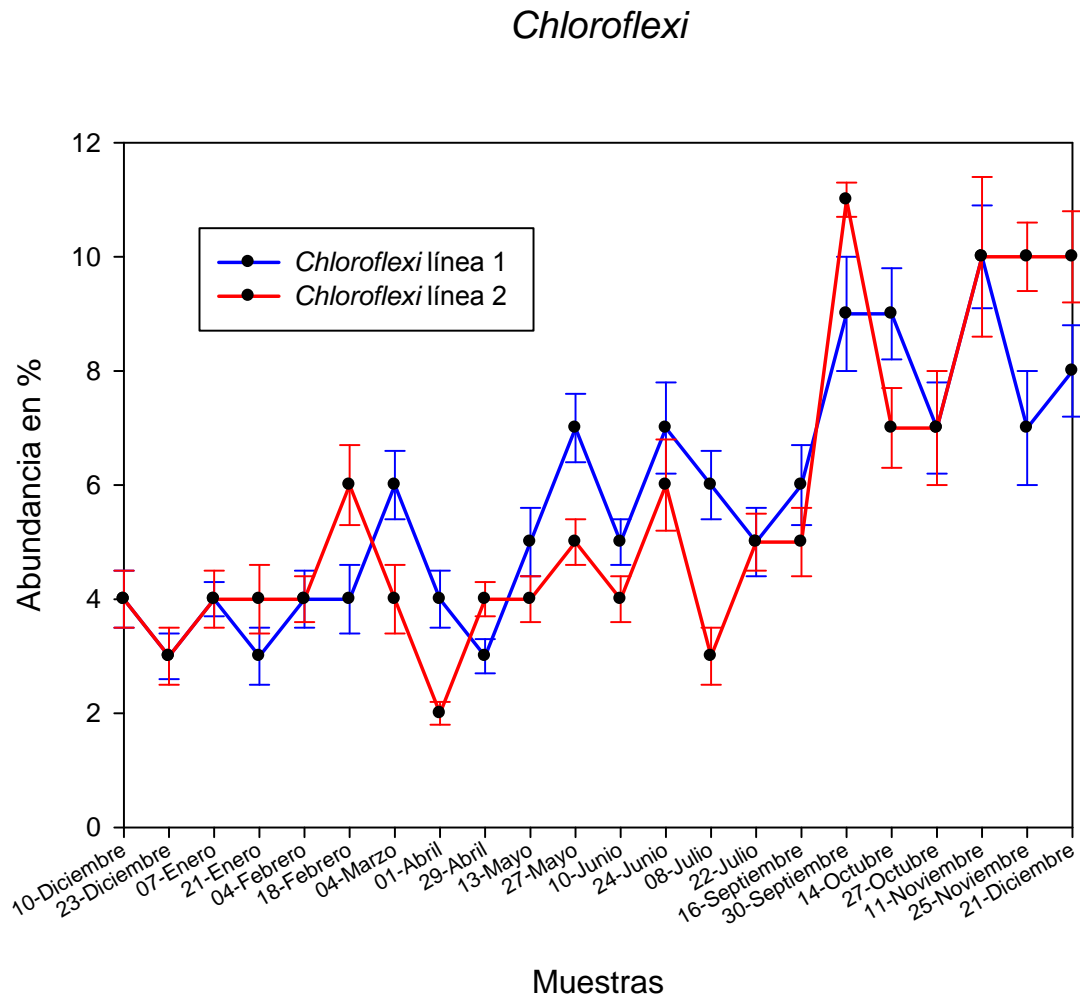


Figura51. Dinámica poblacional de las bacterias *Chloroflexi* en las líneas 1 y 2 de la EDAR del Carraixet.

En la figura 52 se observan las bacterias *Chloroflexi* formando filamentos dentro del flóculo. También se pueden observar algunas células dispersas en el flóculo. Las células de *Chloroflexi* son fáciles de ver por tener una buena señal de hibridación.

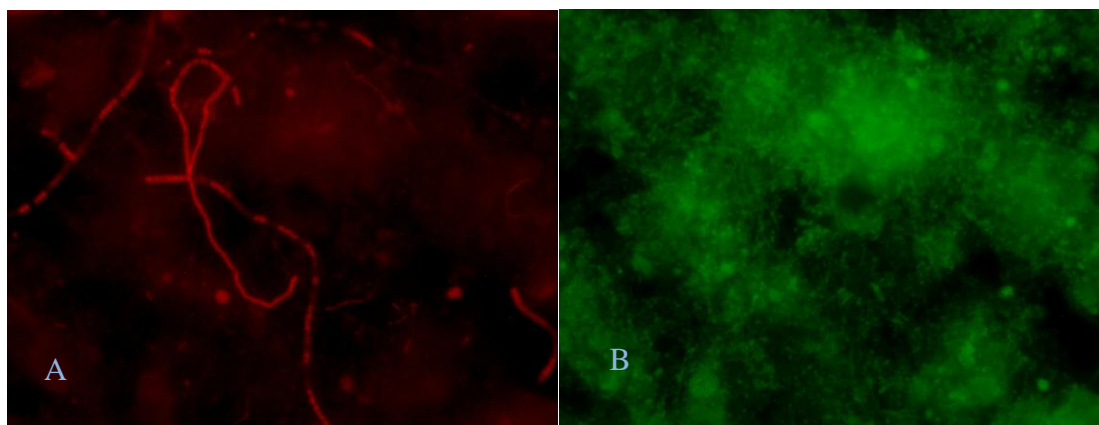


Figura52. Bacterias del phylum *Chloroflexi* en flóculos de la EDAR del Carraixet. A) Corresponde a las bacterias *Chloroflexi*, sonda CFX1223+GNSB941 en TAMRA. B) Corresponde al total de población presente, sonda utilizada EUBmix+ARCH915 en FAM. 600X

Phylum *Proteobacteria*

El phylum *Proteobacteria* es el más abundante en las muestras analizadas con la técnica FISH. Los resultados de las abundancias se detallan por cada clase bacteriana que forman este phylum.

Clase α -*Proteobacteria*

Las bacterias de la clase α -*Proteobacteria* son el segundo grupo dominante dentro del phylum *Proteobacteria*. La sonda usada para la identificación de esta clase ha sido ALF968. En la figura 53 se puede observar el comportamiento de este grupo de bacterias a lo largo del muestreo. La variación poblacional en ambas líneas del tratamiento biológico es similar. Sin embargo en las muestras del 24 de junio y del 25 de noviembre los comportamientos son inversos entre las dos líneas, con una diferencia de abundancia de $\sim 7\%$ (línea 1) y $\sim 5\%$ (línea 2)

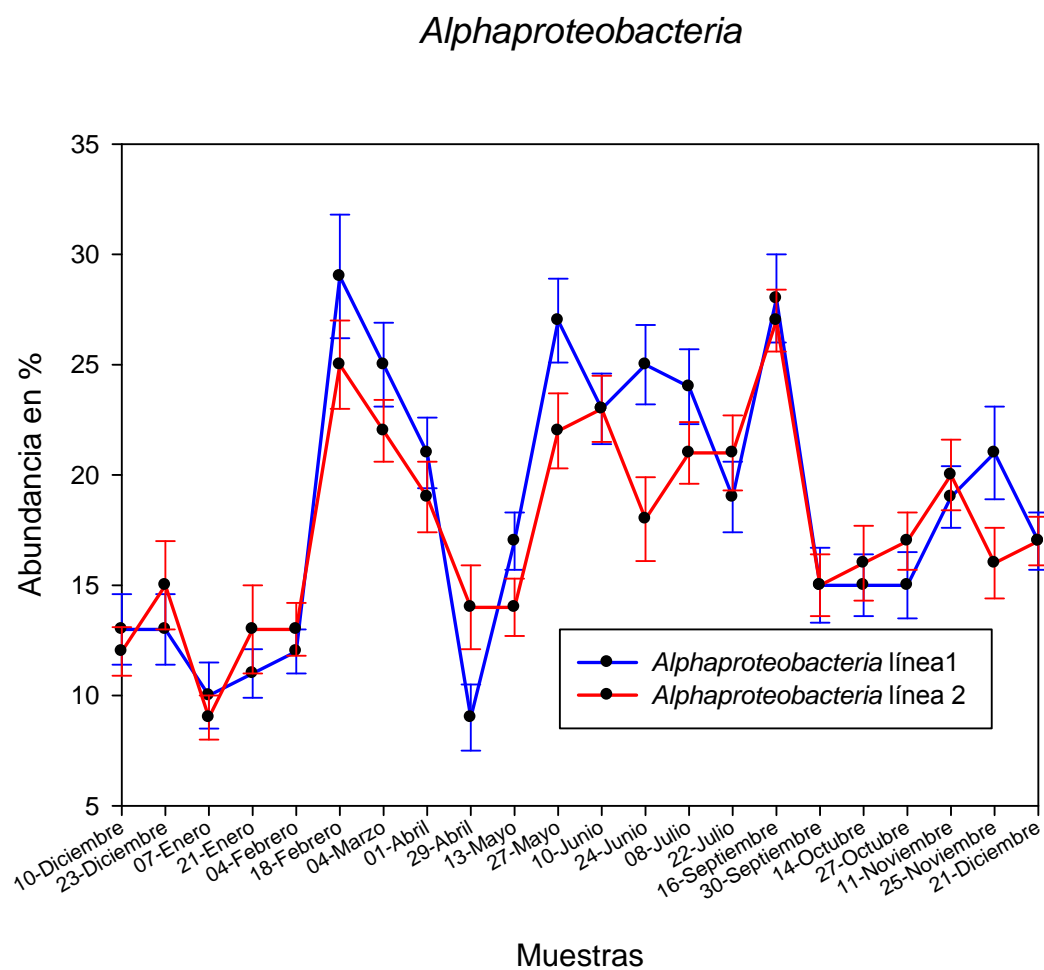


Figura53. Variación de la población de α -Proteobacteria en la EDAR del Carraxeit.

En la figura 54 se muestra las α -Proteobacteria halladas en la EDAR del Carraxiet. Se puede observar las diferentes células que pertenecen a esta clase. Estas bacterias se distribuyen de manera variable dentro del flóculo. Las hibridaciones con las sonda ALF968 dan buenas señales en la hibridación y permite distinguir sin dificultad cada célula hibridada en el flóculo.

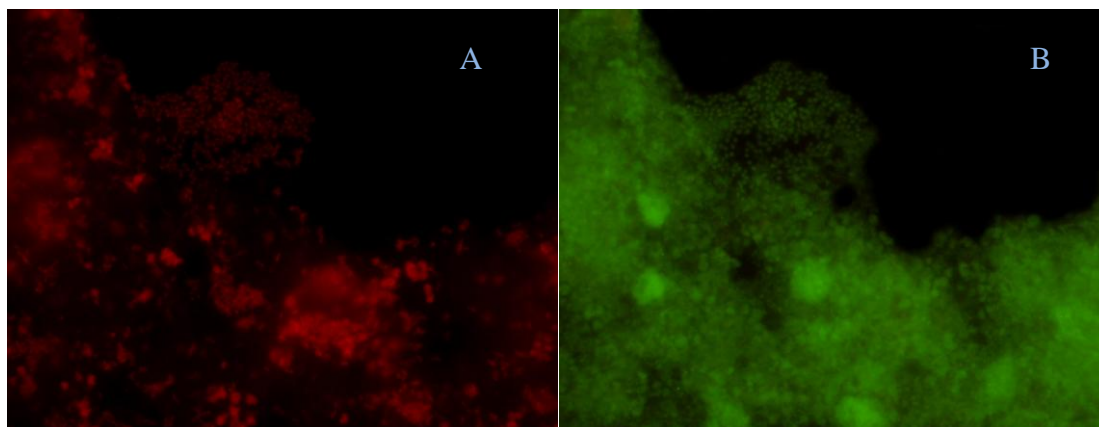


Figura54. α -Proteobacteria en la EDAR del Carraixet. A) Corresponde a células de α -Proteobacteria, sonda ALF968 en TAMRA. B) Corresponde al total de la población de bacterias y arqueas presentes en la muestra, sonda EUBmix+ARCH915 en FAM. 600X.

Clase β -Proteobacteria

Las bacterias de la clase β -Proteobacteria son las dominantes en las muestras analizadas según la técnica FISH. La sonda usada para la identificación de estos organismos es BET42a más su respectiva sonda competidora. En la figura 55 se muestra la variación de abundancias de esta clase de bacterias. El comportamiento de la población de esta clase es muy similar entre las dos líneas de reactores respecto a las abundancias, aunque en la figura 55 se observa que en los meses de diciembre y enero parece que la población entre ambas líneas tiene tendencias diferentes.

Betaproteobacteria

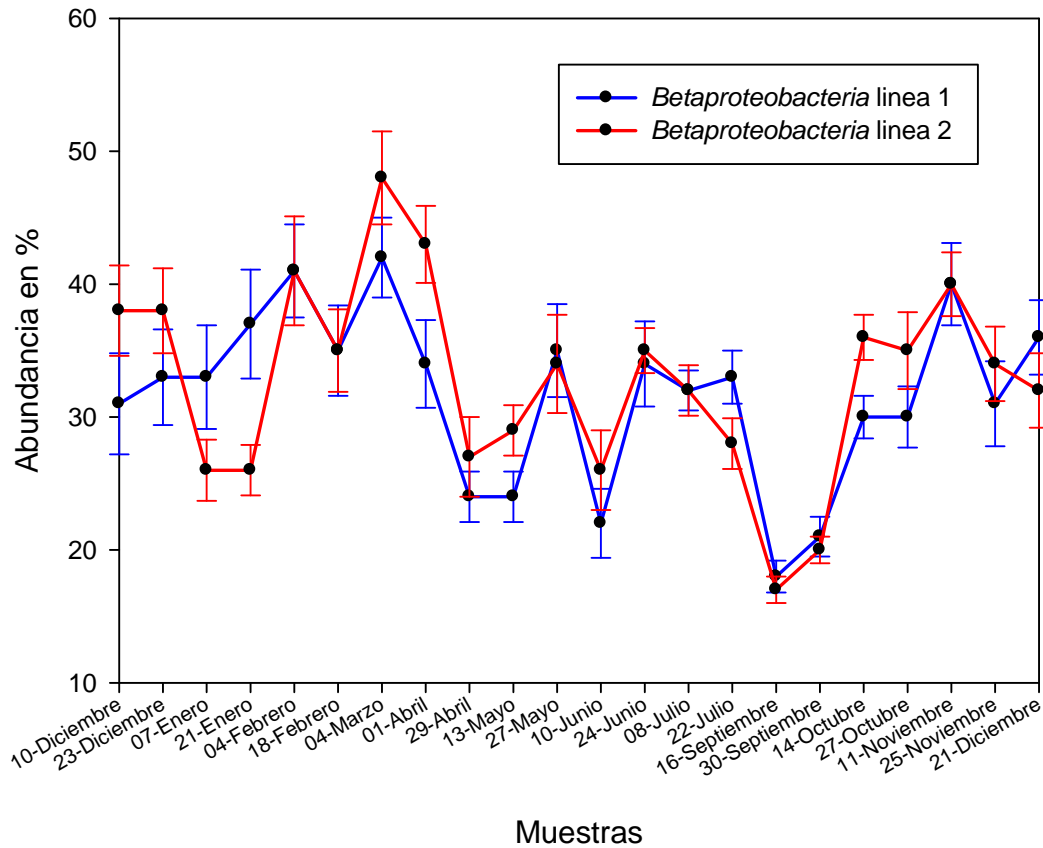


Figura55. Variación de la población β -Proteobacteria en la EDAR del Carraixet.

En la figura 56 se pueden observar las células de β -Proteobacteria. En la figura 56A se puede ver la población de β -Proteobacteria mientras que en la figura 56B se muestra el total de la población de bacterias y arqueas. Comparando ambas imágenes se observa el dominio dentro de la población de la clase β -Proteobacteria. La forma celular varía tal y como se puede observar en la figura 56. Las β -Proteobacteria se pueden encontrar formando agregados bacterianos, algún filamento fino o dispersas en el flóculo.

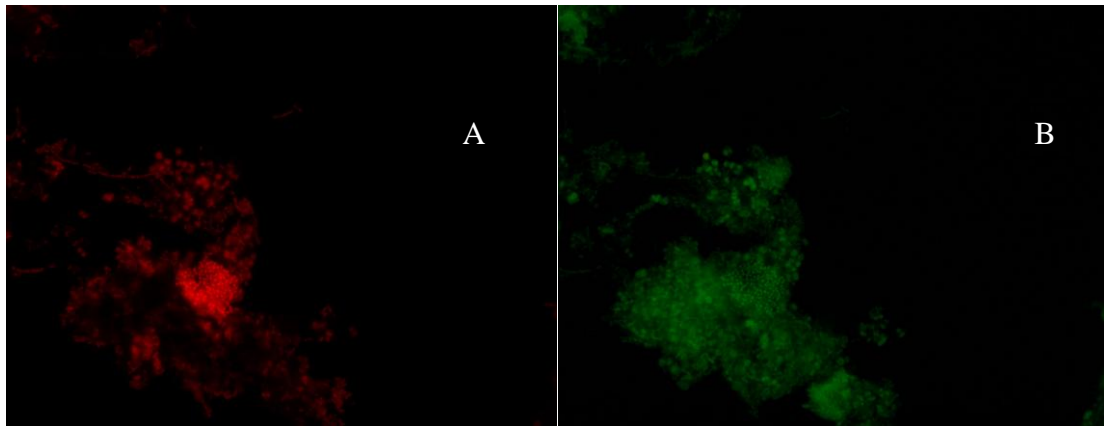


Figura56. β -Proteobacteria en la EDAR del Carraixet. A) Corresponde a las β -Proteobacteria (sonda BET42 +competidora en TAMRA). B) Corresponde al total de la población de bacterias y arqueas (sonda EUBmix+ARCH915 en FAM). 600X.

Clase γ -Proteobacteria

El tercer grupo dominante en las muestras analizadas con la técnica FISH es la clase γ -Proteobacteria. En la figura 57 se puede ver la variación de la abundancia de las γ -Proteobacteria a lo largo del muestreo. La abundancia y la variación las bacterias de esta clase son muy similares en ambas líneas. Sin embargo las muestras del 4 de febrero, 8 de julio, 22 de julio y 11 de noviembre tienen tendencias inversas entre las dos líneas de tratamiento.

En la figura 58 se observan las bacterias pertenecientes a la clase γ -Proteobacteria. Se puede ver que las células de esta clase se encuentran dispersas o agrupadas dentro del flóculo.

Gammaproteobacteria

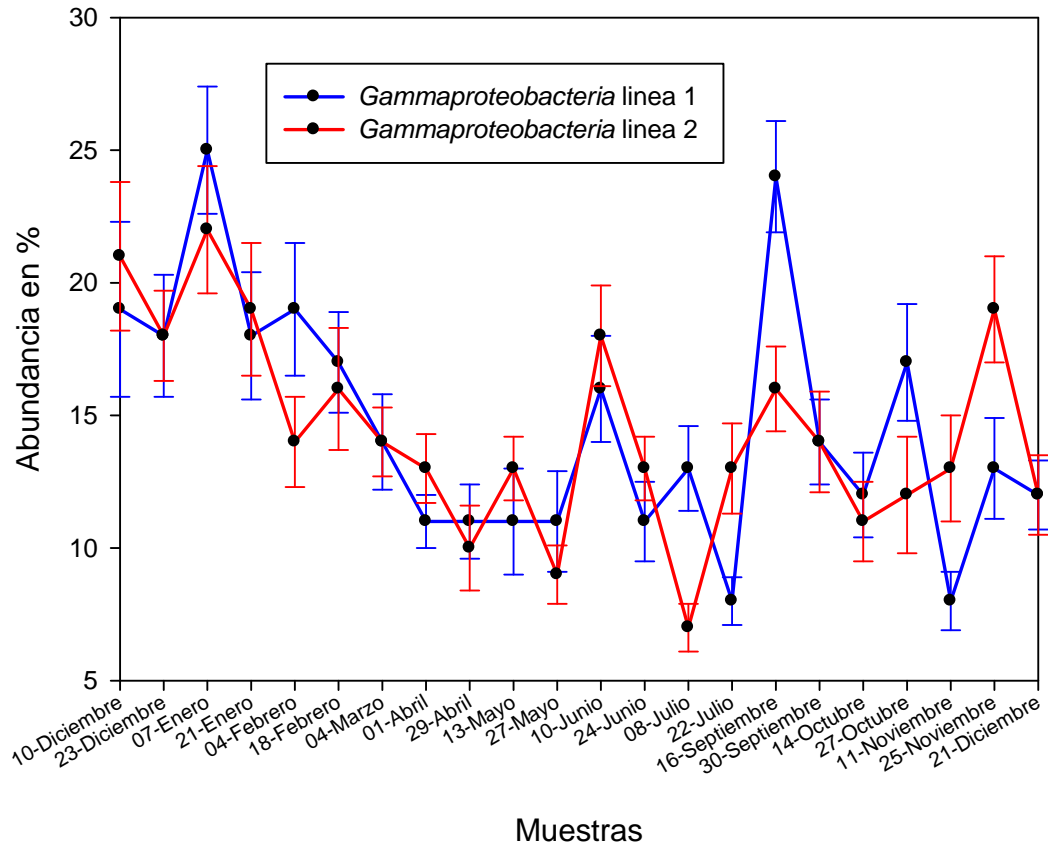


Figura57. Variación de la población de γ -Proteobacteria en la EDAR del Carrixet.

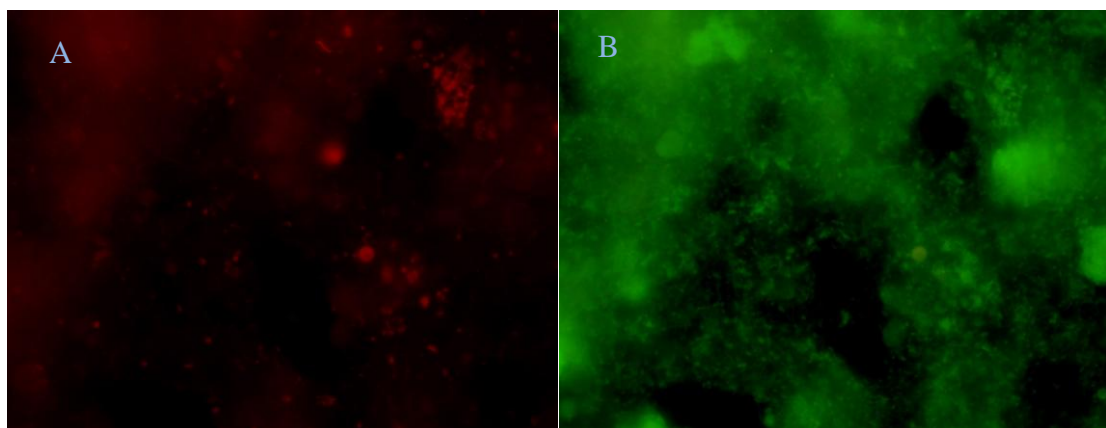


Figura58. γ -Proteobacteria en la EDAR del Carraxet. A) Corresponde a las γ -Proteobacteria hibridadas con GAM42a+Competidora en TAMRA. B) Corresponde a las bacterias y arqueas hibridadas con EUBmix+ARCH915 en FAM. 600X.

Con la sonda GAM42a+Competidora se observó que en muchas muestras de ambas líneas se detectaba mucha abundancia de cocobacilos, como se puede ver en la figura 59. Se observaban también otras formas celulares. En la figura 59 se indican las células diferentes de los cocobacilos hibridados.

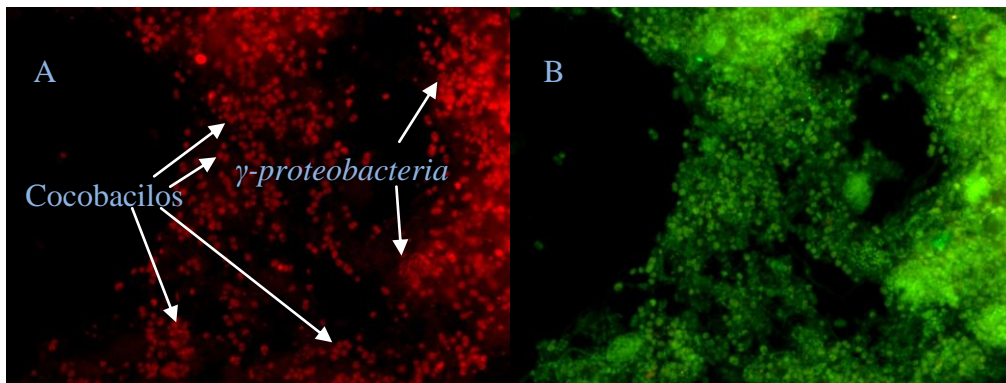


Figura59. Cocobacilos γ -Proteobacteria presentes en la EDAR del Carraixet. 600X.

La mayor abundancia de los cocobacilos encontrados de la clase γ -Proteobacteria se alcanzó en los meses de diciembre y enero, y disminuye drásticamente en febrero. Esto coincide con los meses de mayor abundancia hallados en este estudio con excepción de la muestra del 16 de septiembre en la línea 1.

Clase δ -Proteobacteria

Para la detección de las bacterias de la clase δ -Proteobacteria se utilizaron las sondas DELTA495a + DELTA495b + DELTA495c y sus respectivas competidoras.

En la figura 60 se indica la variación anual de las δ -Proteobacteria. La variación de la población de esta clase de bacterias es diferente entre las dos líneas de tratamiento biológico. En la línea 2 la variación oscila entre 1-2 % mientras que en la línea 1 la variación es mayor, llegando hasta el 3%.

Deltaproteobacteria

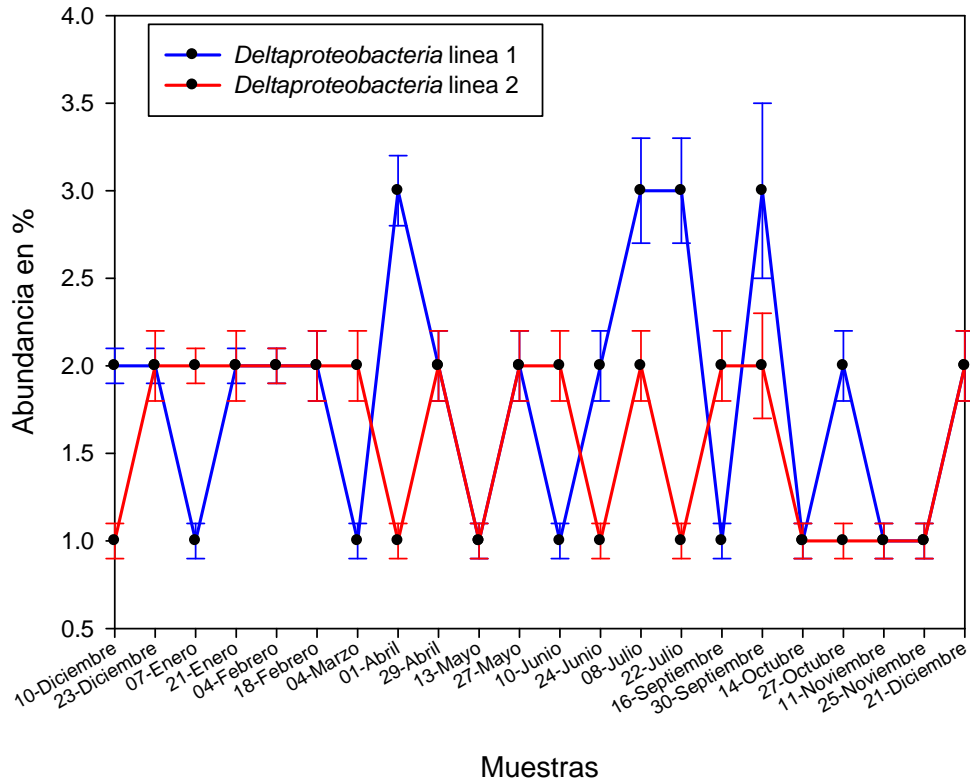


Figura 60. Variación de la población de δ -*Proteobacteria* en la EDAR del Carraixet.

En la figura 61 se observan las bacterias híbridadas de la clase δ -*Proteobacteria*. Éstas células se pueden encontrar formando agregados, dispersas o formando filamentos, sin embargo en la figura 61 solo se ven formando agregados.

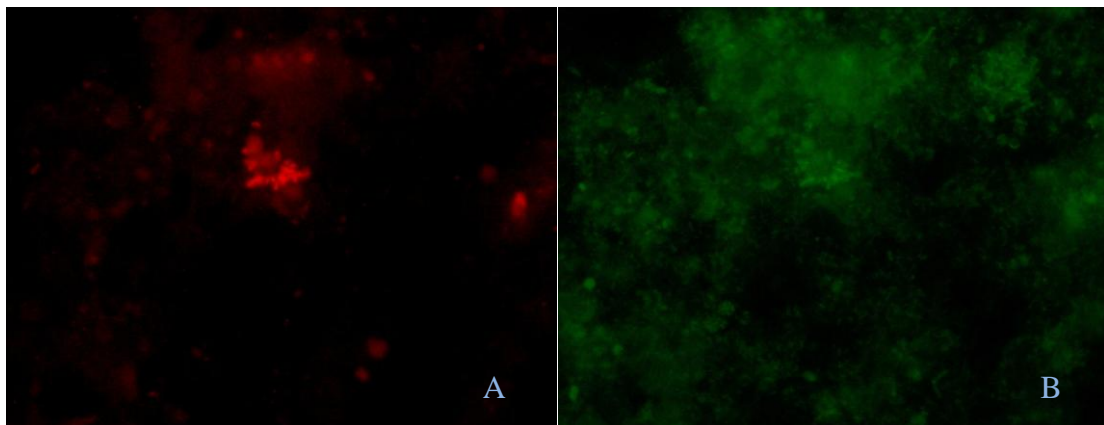


Figura 61. δ -*Proteobacteria* en fangos activos de la EDAR del Carraixet. A) Corresponde a las bacterias híbridadas con DELTAmix. B) Corresponde a las bacterias híbridadas con EUBmix+ARCH915. 600X.

Resumiendo este apartado, el phylum *Proteobacteria* es el más abundante en la población de las muestras analizadas. Dentro de este phylum la clase β -*Proteobacteria* es el dominante, seguidas por α -*Proteobacteria*.

Phylum *Planctomycetes*

El phylum *Planctomycetes* ha presentado mucha variación en su abundancia a lo largo del muestreo respecto a su abundancia, como se refleja en la figura 62. La sonda utilizada para las hibridaciones de este phylum ha sido PLA46.

Las bacterias *Planctomycetes* se encuentran en niveles inferiores al 10% de la población, como se puede apreciar en la figura 62. Las variaciones en la abundancia entre las dos líneas es similar, excepto en las muestras 23 de diciembre y 7 de enero, en las que el comportamiento es inverso entre las líneas.

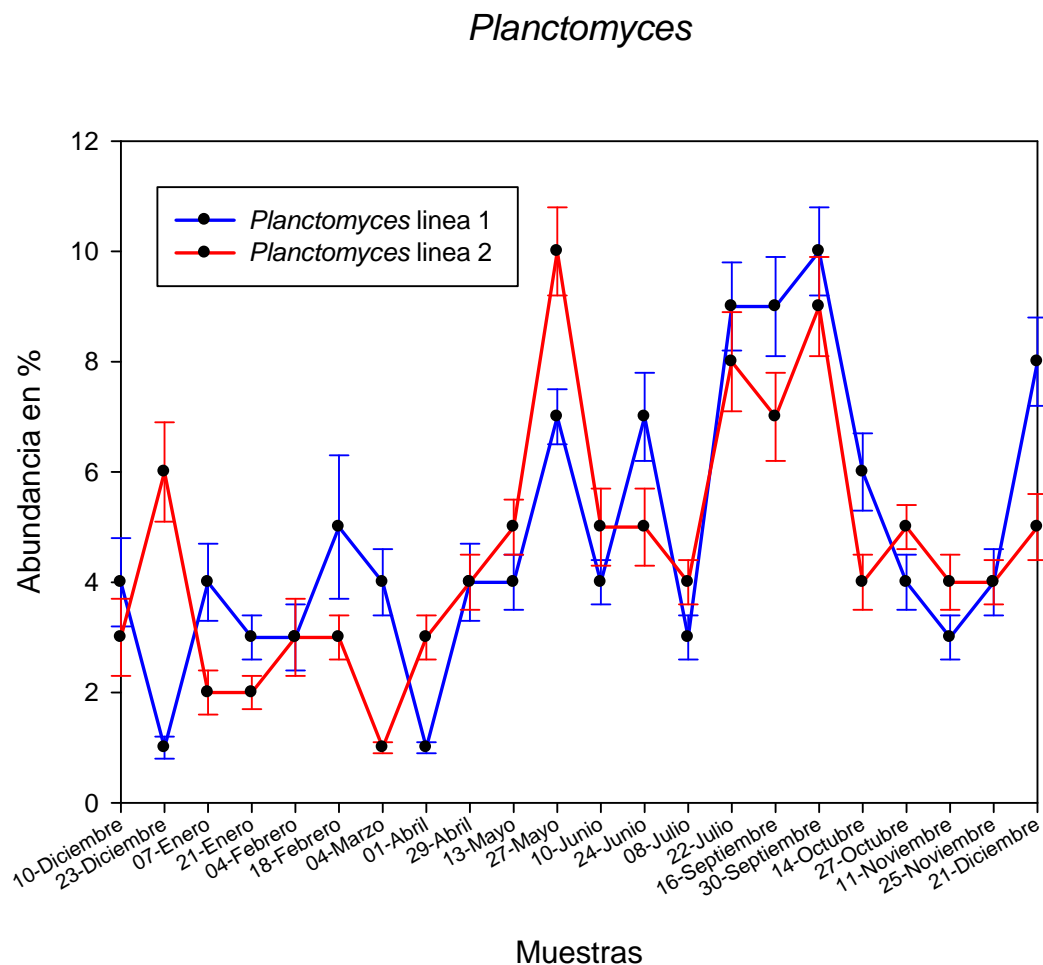


Figura62. Variación de la población de *Planctomyces* en fangos activos de la EDAR del Carraixet.

En la figura 63 se observan las bacterias *Planctomycetes* hibridadas en una de las muestras analizadas. Estas bacterias pueden aparecer formando agrupaciones entre ellas y algunas dispersas en el flóculo. En la figura 63 se puede observar que la mayoría de las células de este phylum se encuentran agrupadas dentro del floculo y algunas células dispersas.

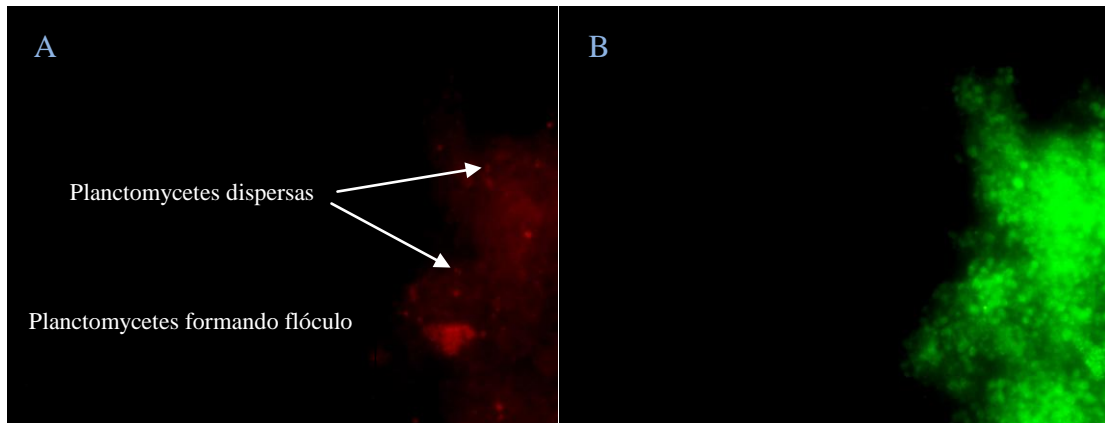


Figura63. *Planctomycetes* en fangos activos en la EDAR del Carraixet. 600X.

4.3.1 Identificación y cuantificación de los diversos grupos funcionales del dominio Bacteria

Bacterias Nitrificantes

Las sondas específicas utilizadas para la detección de las bacterias nitrificantes han sido: para las oxidantes de amonio a nitrito (AOB) NSO1225LNA y para las oxidantes de nitrito a nitrato (NOB) Ntspa712 (Phylum *Nitrospira*) y NIT3 (*Nitrobacter*).

En el rol de organismos nitrificantes también se considera en nuestra población a las arqueas amonio oxidantes (AOA), ya expuestas en el apartado de arqueas.

En la figura 64 se pueden observar a las abundancias de las AOB a lo largo del muestreo.

La variación de la población de AOB entre los meses de marzo a octubre es muy similar. En la mayoría de las muestras comprendidas entre abril y septiembre se puede ver cierta asimetría entre las líneas pero con abundancias muy similares. Entre estos meses hay cierta estabilidad entre la abundancia de las AOB.

Ammonia-Oxidizing Bacteria

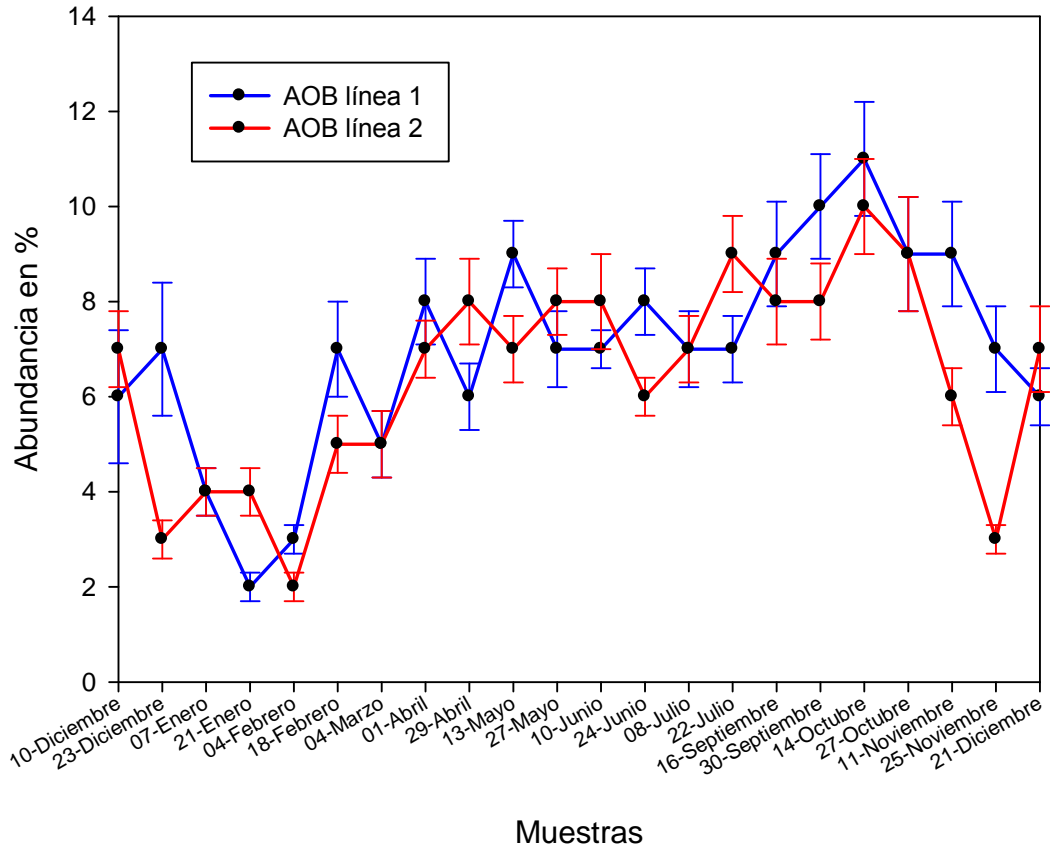


Figura64. Variación de la población de AOB en fangos activos de la EDAR del Carraixet.

En la figura 65 se observan los densos agregados celulares característicos de las AOB (figura 65A) y su distribución en el flóculo.

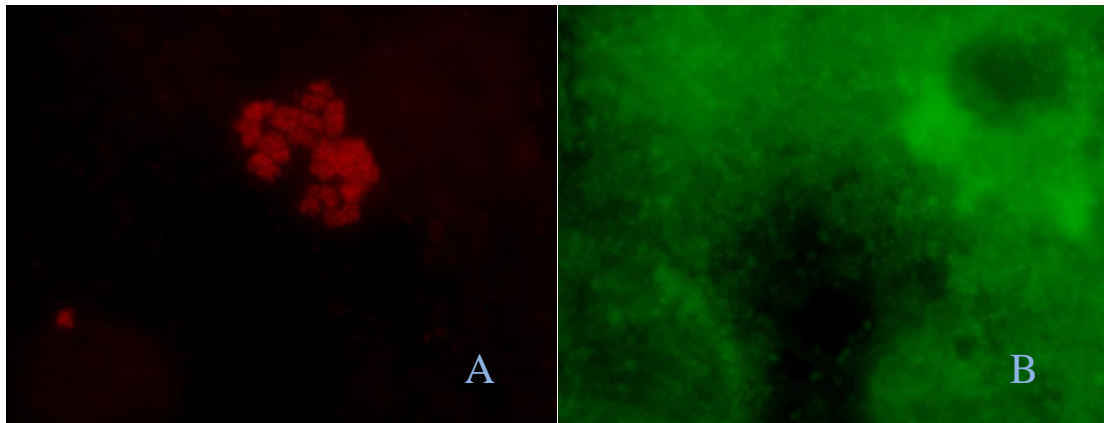


Figura65. AOB presentes en los fangos activos de la EDAR del Carraixet. A) corresponde a la sonda NSO1225LNA en Tamra. B) corresponde a las sondas EUBmix+ARCH915 en FAM. 600X.

No se han obtenido resultados positivos en las hibridaciones con la sonda NIT3 correspondiente a *Nitrobacter*. Cabe recordar que miembros del phylum *Nitrospira* pertenece a este grupo de bacterias nitrificantes, posiblemente estos miembros NOB sean los que estén presentes en las muestras analizadas y no *Nitrobacter*.

Phylum *Nitrospira*

Con la sonda Ntspa712 que corresponde al phylum *Nitrospira* se detectaron en las muestras células positivas en la mayoría de las muestras analizadas. En 10 muestras no se pudo realizar la cuantificación porque las abundancias eran inferiores al 1% y se les atribuyó un valor de 0.5% de abundancia. En 12 muestras no se consiguió una hibridación positiva. Para confirmar la ausencia de *Nitrospira* las muestras se visualizaron con el objetivo 100X. En la figura 66 se puede observar la variación de la población de *Nitrospira* en las dos líneas de la EDAR del Carraixet.

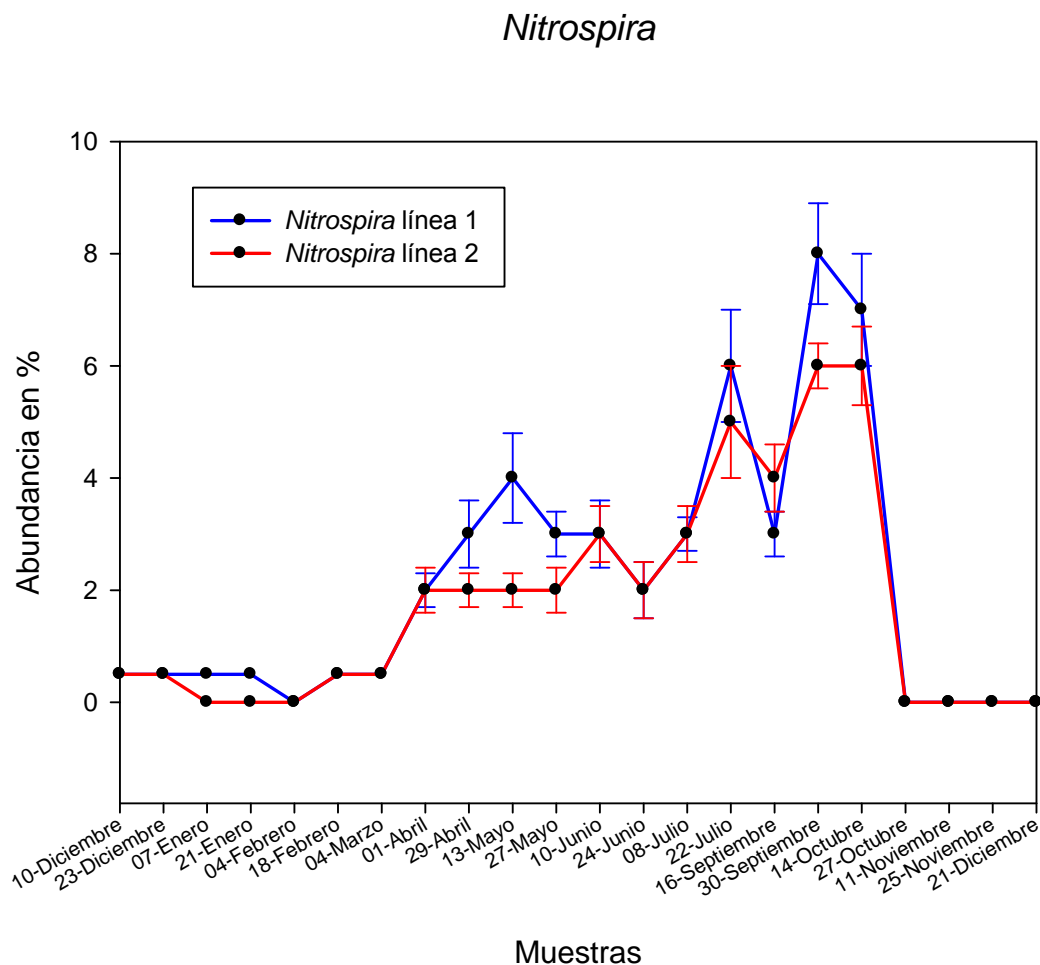


Figura 66. Variación en el tiempo del phylum *Nitrospira* en la EDAR del Carraixet.

La variación y abundancia de las *Nitrospira* en las dos líneas de tratamiento son muy similares, a excepción de las muestras del 13 de mayo y 30 de septiembre, en las que la población en la línea 1 es un 2% mayor que en la línea 2.

En la figura 67 se observa que las células de *Nitrospira* forman agregados entre ellas. Las señales que se obtienen en la hibridación de estas bacterias son intensas y fáciles de detectar.

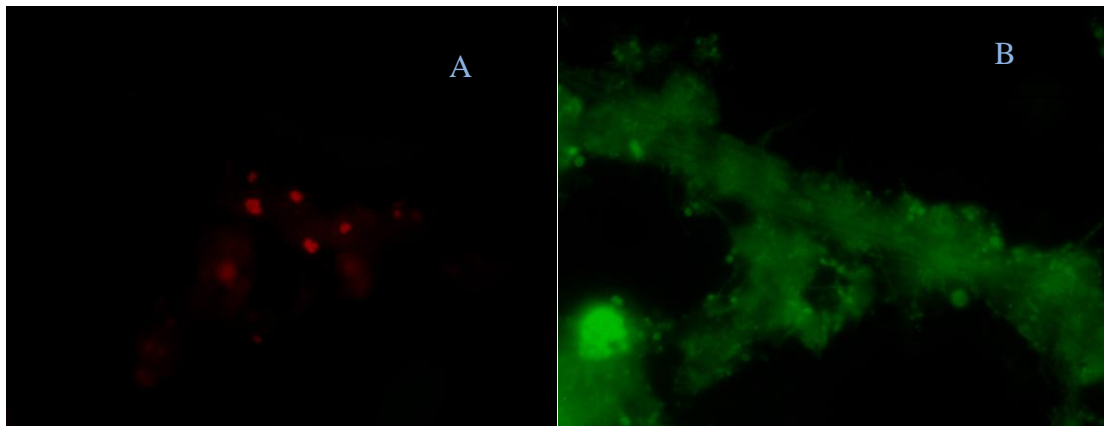


Figura 67. Células de *Nitrospira* en los flóculos de la EDAR del Carraixet. A) phylum *Nitrospira*, sonda Ntspa712 en TAMRA. B) Corresponde al total de la población presente, sonda EUBmix+ARCH915 en FAM. 600X.

Bacterias Desnitrificantes

En el grupo de bacterias desnitrificantes se utilizó la sonda AT1458 para detectar los géneros *Azoarcus*, *Thauera*, y las sondas PAR651 y TBD1419 para detectar los géneros *Paracoccus* y *Thiobacillus denitrificans*, respectivamente.

Los géneros *Azoarcus* y *Thaurea* se seleccionaron para el análisis de las muestras ya que están presentes entre las bacterias desnitrificantes dominantes en fangos activos de aguas domésticas y de aguas industriales. Por otro lado las características de las aguas de Valencia, en cuanto a la presencia de sulfatos puede favorecer la proliferación de las bacterias sulfato reductoras, y junto a éstas a otras bacterias como *Paracoccus* y *Thiobacillus denitrificans*.

Se obtuvo resultados positivos de presencia para la sonda AT1418 es decir *Azoarcus*, *Thauera* y la sonda PAR651 que corresponde al género *Paracoccus*. La variación a lo largo del muestreo de la población de *Azoarcus* y *Thauera* se indica en la figura 68.

Azoarcus-Thauera

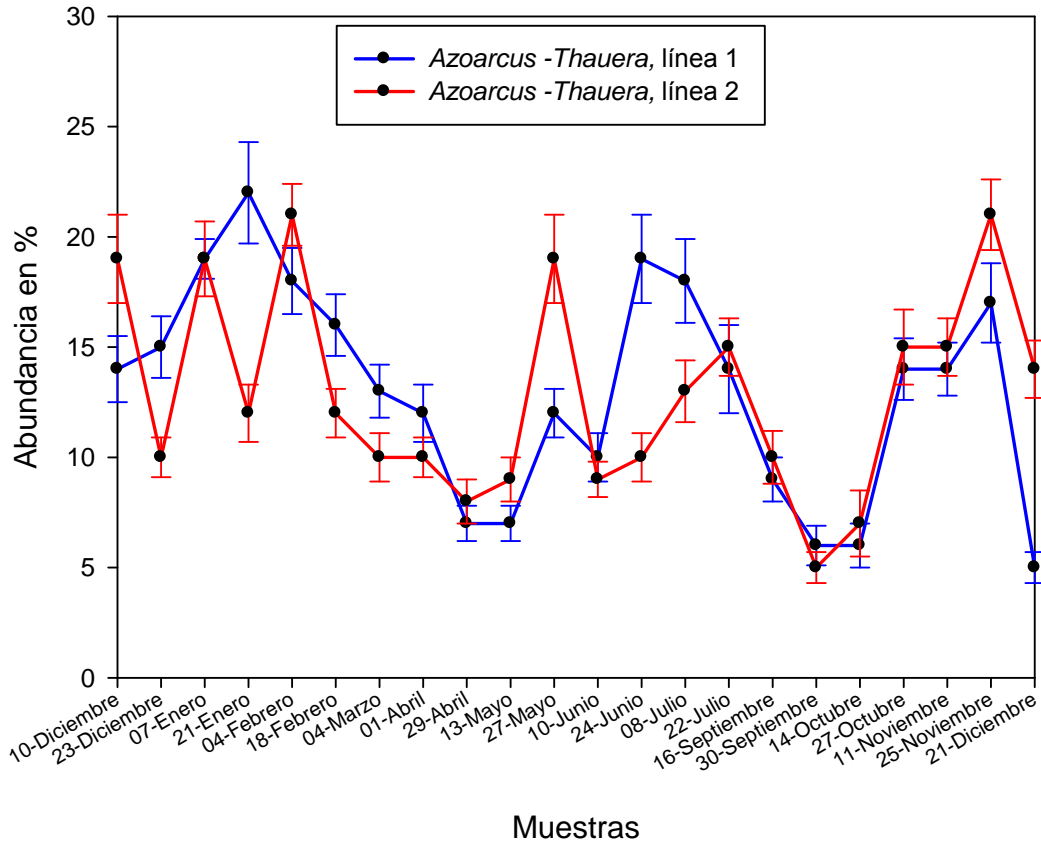


Figura 68. Variación de las bacterias Desnitrificantes *Azoarcus* y *Thauera* en los fangos activos de la EDAR del Carraixet.

En el gráfico de la figura 68 se puede ver que a partir de la muestra del 22 de julio hasta el 21 de diciembre, las tendencias son idénticas entre ambas líneas. Las abundancias son muy parecidas a lo largo del muestreo, en general las tendencias son similares.

Paracoccus no se cuantificó porque no superaba el 1% de la población. Estas bacterias se visualizaron en todas las muestras con excepción de la muestra del 30 de septiembre de la línea 1. El resultado puede verse en el anexo 2.

En la figura 69 se puede ver las bacterias hibridadas con la sonda AT1418 (*Azoarcus - Thauera*), las señales de la hibridación con esta sonda son de fácil detección. En la figura 70 se puede observar la señal débil para las bacterias del género *Paracoccus*.

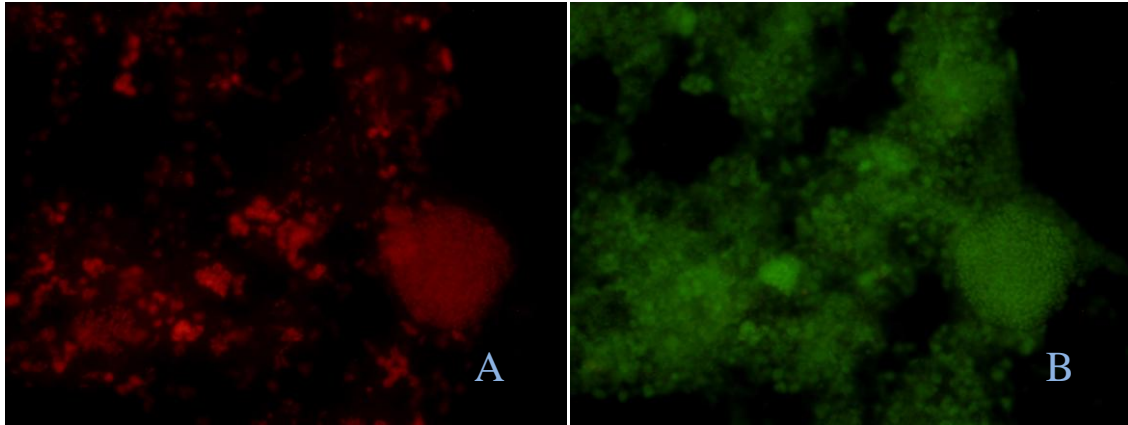


Figura 69. *Azoarcus –Thauera* presentes en fangos activos en la EDAR del Carraixet. A) Corresponde a la sonda AT1418. B) Corresponde a las sondas EUBmix+ARCH915. 600X.

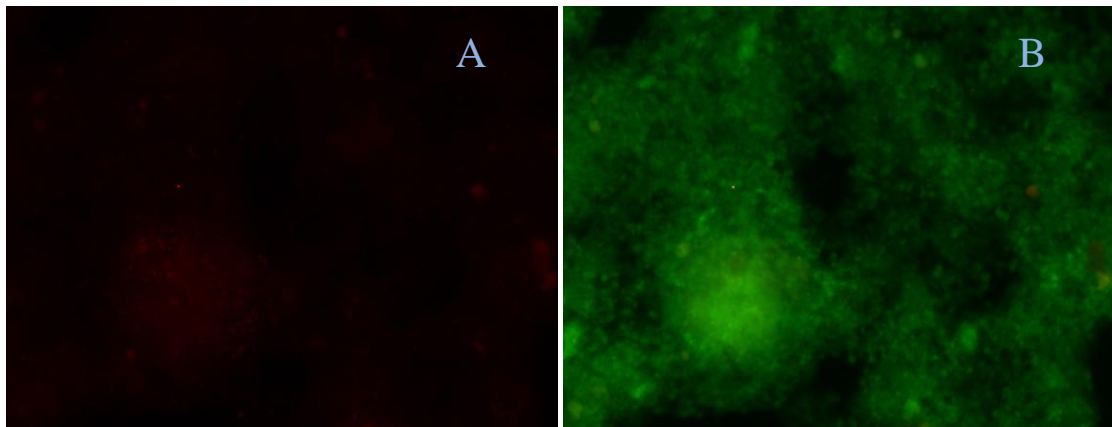


Figura 70. *Paracoccus* presente en los fangos activos de la EDAR del Carraixet. A) Corresponde a la sonda PAR651. B) Corresponde a las sondas EUBmix+ARCH915. 600X.

Bacterias PAO

Para la identificación de las bacterias PAO se realizó la hibridación con una mezcla de las sondas PAO462, PAO651 y PAO846 (PAOmix).

En la figura 71 se puede observar la variación de la población de bacterias PAO durante el muestreo.

En el gráfico de la figura 71 se aprecia que entre los meses de septiembre a noviembre se presentan las mayores abundancias de PAO. Las tendencias son similares entre las dos líneas. En tres de las muestras no se detectaron PAO, la muestra del 29 de abril y 27 de mayo de la línea 1, y la muestra del 13 de mayo de la línea 2. En varias muestras en ambas líneas las abundancias han sido inferiores al 1%.

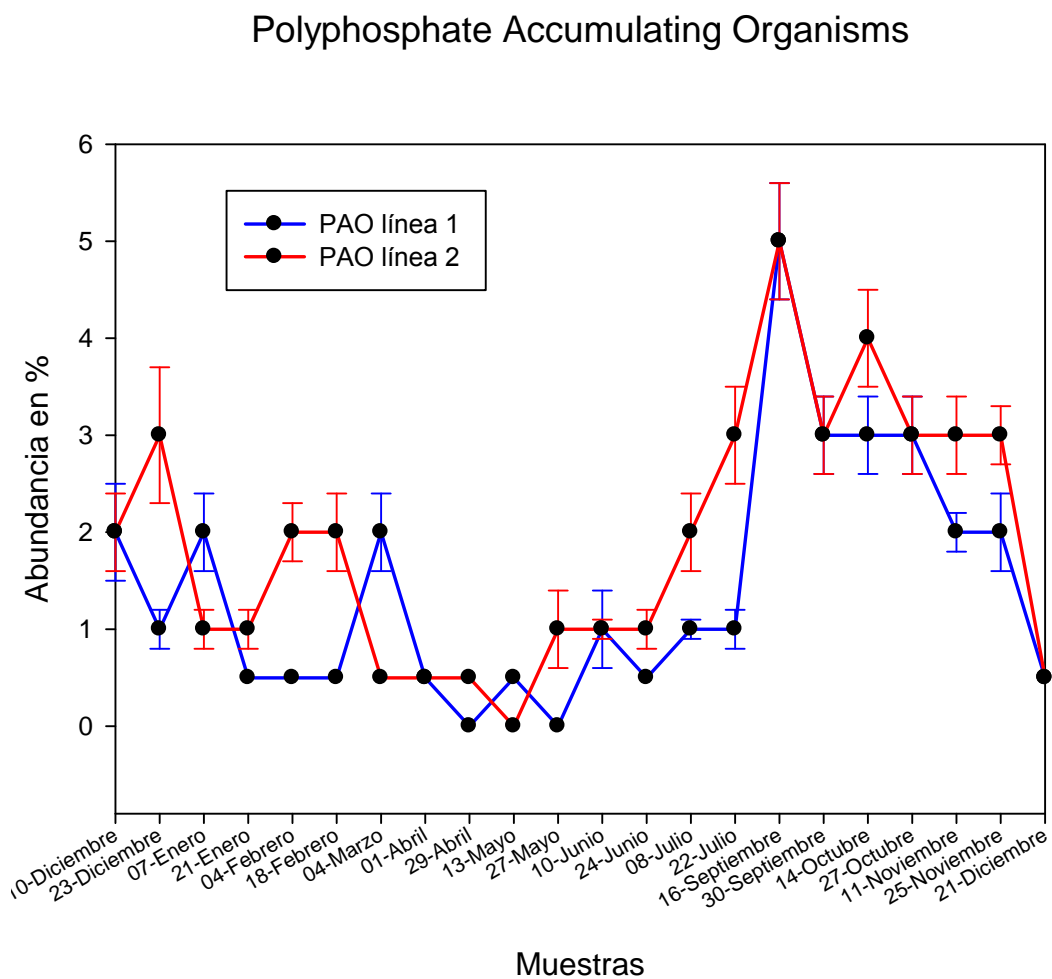


Figura 71. Variación de las PAO en la EDAR del Carraixet.

En general en la figura 71 se puede observar que en la línea 2 se detecta una mayor abundancia de bacterias pertenecientes al fenotipo PAO. En la figura 72 se pueden ver las bacterias PAO y su distribución dentro del floculo.

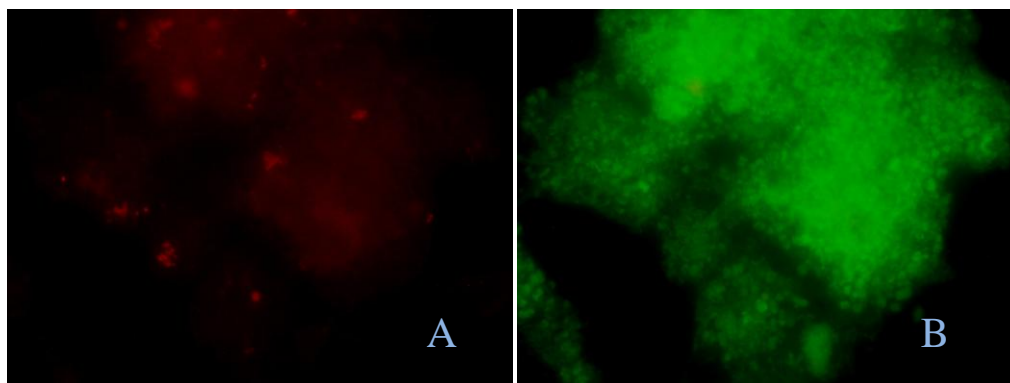


Figura 72. PAO presentes en fangos activos en la EDAR del Carraixet. A) Corresponde a la sonda PAOmix en TAMRA.B) Corresponde a las sondas EUBmix+ARCH915. 600X.

Bacterias GAO

Para la identificación de las bacterias acumuladoras de glucógeno (GAO) se utilizaron las sondas GAOMix (GAOQ431 y GAOQ989) que hibridan sobre los *Candidatus competibacter phosphatis* y a las formadoras de tétradas (TFO) miembros putativos de las GAO, las sondas DFO mix1 (TFO_DF218 y TFO_DF618) y DFO mix2 (DF988 y DF1020) junto con su sondas competidoras, que hibridan con *Defluvicoccus*.

En el anexo 2 se presentan los resultados de las hibridaciones con las sonda GAOMix, ya que estos no superan el 1% de la población en la mayoría de las muestras.

En la figura 73 se observa las variaciones de abundancias detectadas en las poblaciones de GAO correspondientes a *Defluvicoccus* en las dos líneas de tratamiento. En la figura 73 se observan los miembros TFO (*Defluvicoccus cluster 2*) hibridados con la sonda DFOmix 2. Los comportamientos son distintos entre las dos líneas.

Glycogen Accumulating Organisms

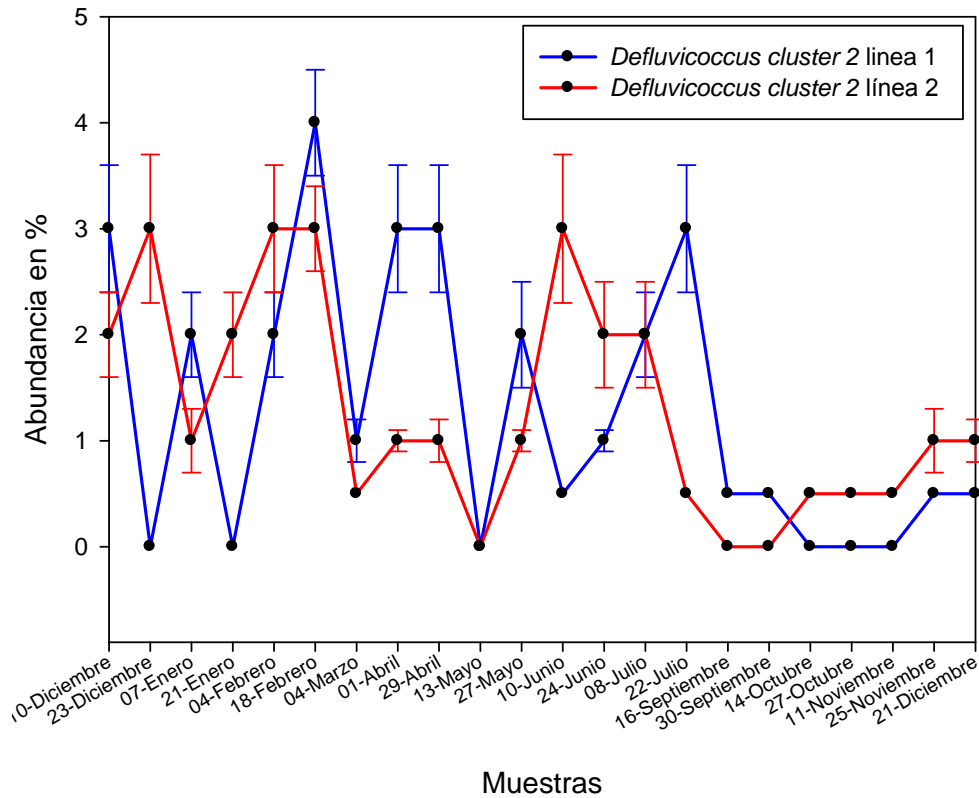


Figura 73. Variación de la población de GAO en la EDAR del Carraixet.

En la figura 74 se pueden observar las bacterias GAO, tanto las hibridadas con la sonda GAOMix (figura 74A) como las hibridadas con la sonda DFOMix2 (figura 74C). En las imágenes se puede observar las diferencias en cuanto morfología celular que presentan estas bacterias. En general este grupo de bacterias presenta poca abundancia.

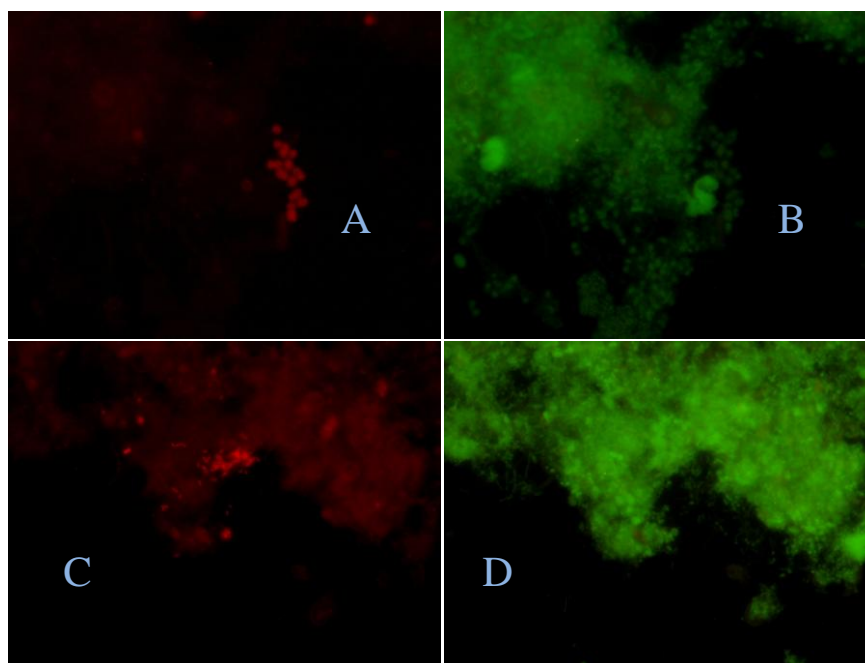


Figura 74. GAO presentes en fangos activos en la EDAR del Carraixet. A) Corresponde a *Candidatus competibacter phosphatis*. C) Corresponde a *Defluvicoccus*. B y D) Corresponde al total de bacterias hibridadas con EUBmix+ARCH915. 600X.

Bacterias Metanotrofas

Las bacterias metanotrofas están presentes en todas las muestras analizadas, sin embargo no han podido ser cuantificadas. Las bacterias hibridadas con la sonda Mg84 (*Methylocystaceae* tipo 1 pertenecientes a la clase α -*Proteobacteria*) son difíciles de cuantificar ya que la señal de hibridación es muy débil y no se resalta respecto a la señal de fondo como se puede apreciar en la figura 75.

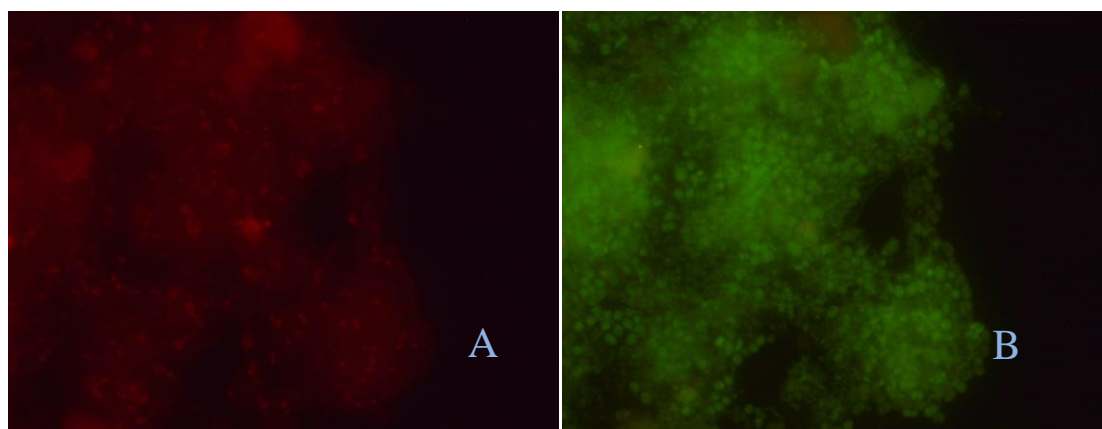


Figura 75. Metanotrofas cluster Tipo 1 en fangos activos en la EDAR del Carraixet. A) Corresponde a la sonda Mg84. B) Corresponde a las sondas EUBmix+ARCH915. 600X.

Las bacterias hibridadas con la sonda Ma464 (*Methylocystaceae* tipo 2 pertenecientes a la clase γ -*Proteobacteria*), presentaron mejor señal de hibridación que el otro grupo de metanotrofas, sin embargo su abundancia fue en su mayoría inferior al 1%. Los resultados de la hibridación de este grupo de bacterias se indican en el anexo 2. En figura 76 se puede observar una hibridación con esta sonda.

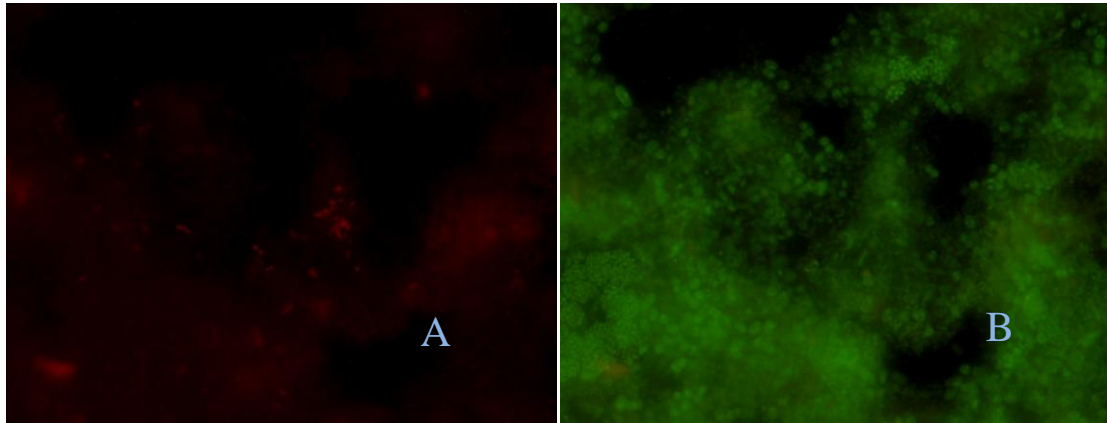


Figura 76. Metanotrofas *cluster* tipo 2 presentes en fangos activos en la EDAR del Carraixet. A) Corresponde a la sonda Ma464. B) Corresponde a las sondas EUBmix+ARCH915. 600X.

Bacterias sulfato reductoras

Para la detección de las bacterias sulfato reductoras (SRB) se utilizaron varias sondas, la mayoría para la detección de géneros de la clase δ -*Proteobacteria* (DSV687; Dsb804; DNMA657 y DBB660). También se utilizó la sonda Dtm230 que detecta las sulfato reductoras pertenecientes al phylum *Firmicutes* y las sondas generales de las bacterias sulfato reductoras SRB385 y SRB385Db.

Se obtuvo resultados positivos con las sondas DSV687 (orden *Desulfovibrionales*) y con Dtm230 (género *Desulfomaculum*) (figura 77). En todas las muestras se visualizan bacterias hibridadas pero al ser menos del 1% se les asignó el valor de 0.5% (anexo 2).

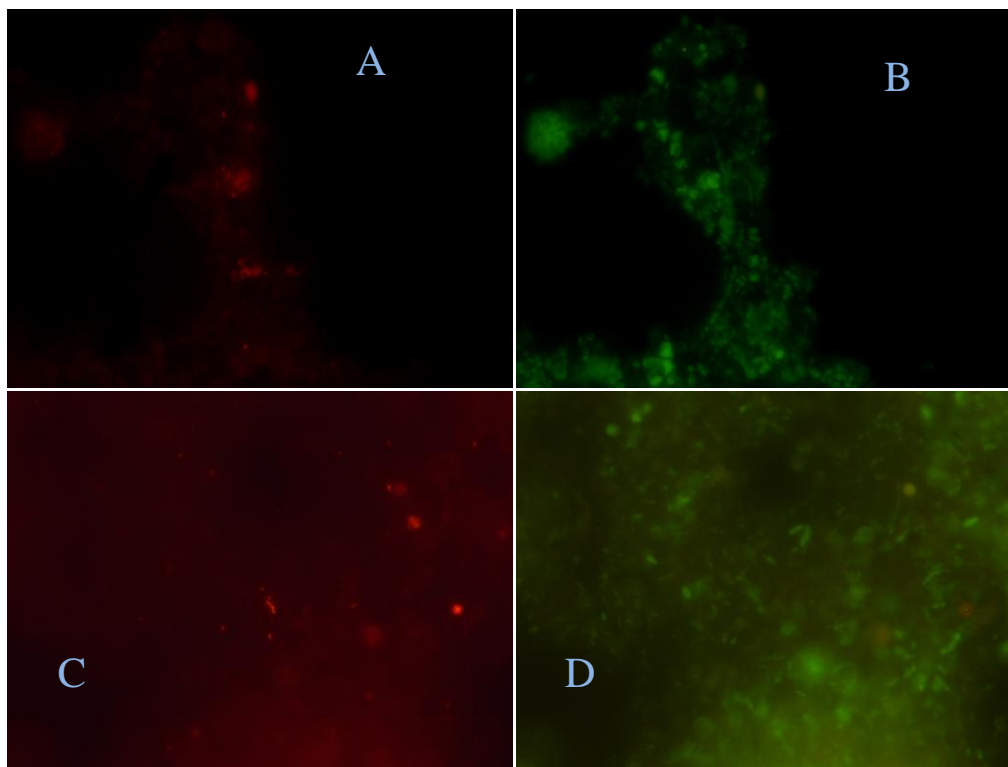


Figura 77. SRB presentes en los fangos activos de la EDAR del Carraixet. A) Corresponde a las bacterias hibridadas con la sonda DVS687 en Tamra. C) Corresponde a las bacterias hibridadas con la sonda Dtm230 en Tamra. B y D) Corresponde a la población general hibridada con EUBmix+ARCH915 en Fam. 600X.

Las hibridaciones con la sonda DNMA657 (género *Desulfonema*) fueron positivas. En la figura 78 se puede ver la variación a lo largo del muestreo de este género.

La población de *Desulfonema* presenta mucha variabilidad y comportamientos diferentes entre las líneas de tratamiento.

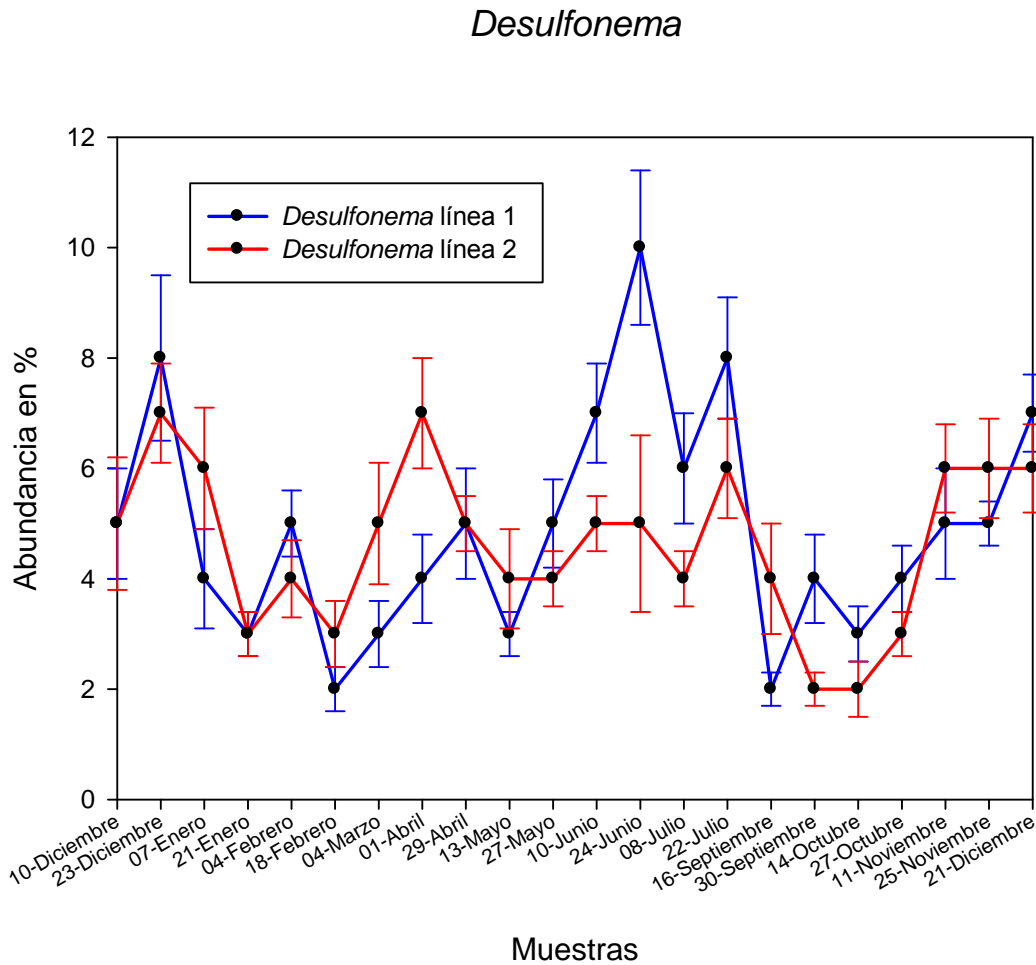


Figura 78. Variación de la población de *Desulfonema* en la EDAR del Carraixet.

Entre los meses junio y julio en la línea 1, se observan las mayores abundancias de *Desulfonema*. Entre las muestras 10 de diciembre hasta 18 de febrero, las muestras 29 de abril hasta 27 de mayo, y las muestras 14 de octubre hasta 21 de diciembre, los porcentajes de abundancias entre las líneas son parecidos.

Las variaciones de la población de SRB hibridadas con las sondas generales (SRB385 y SRB385Db) de este grupo de bacterias, se muestran en las figura 79 y 80 respectivamente.

El género *Desulfonema* está comprendido dentro de las bacterias que hibridan con la sonda general SRB385Db.

Sulphate Reducing Bacteria

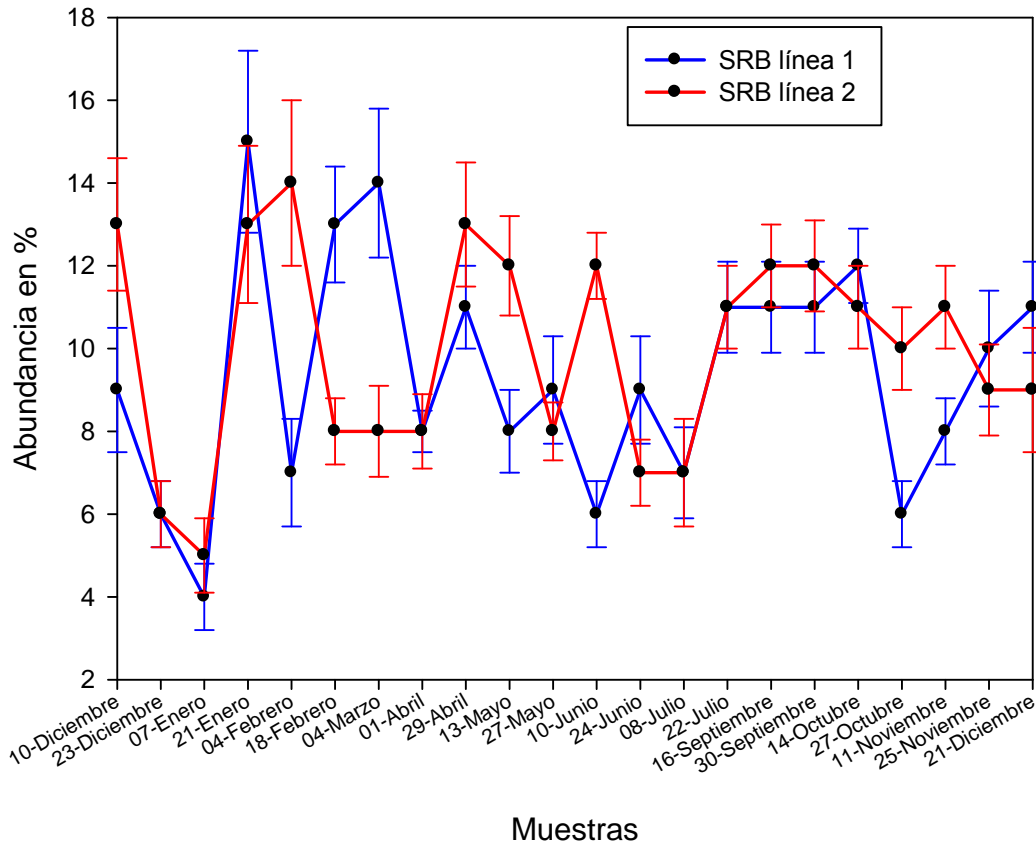


Figura 79. Variación de las SRB hibridadas con la sonda SRB385 en fangos activos en la EDAR del Carraixet.

En la figura 79 se presenta las variaciones de la población de SRB detectadas con la sonda SRB385 en las dos líneas. Los porcentajes de abundancia son similares entre las dos líneas en la mayoría de las muestras (10 de diciembre, 7 de enero, 21 de enero, 1 de abril, 29 de abril, 27 de mayo, 24 de junio, 8 de julio, 22 de julio, 16 de septiembre, 30 de septiembre, 14 de octubre, 25 de noviembre y 21 de diciembre).

Sulphate Reducing Bacteria

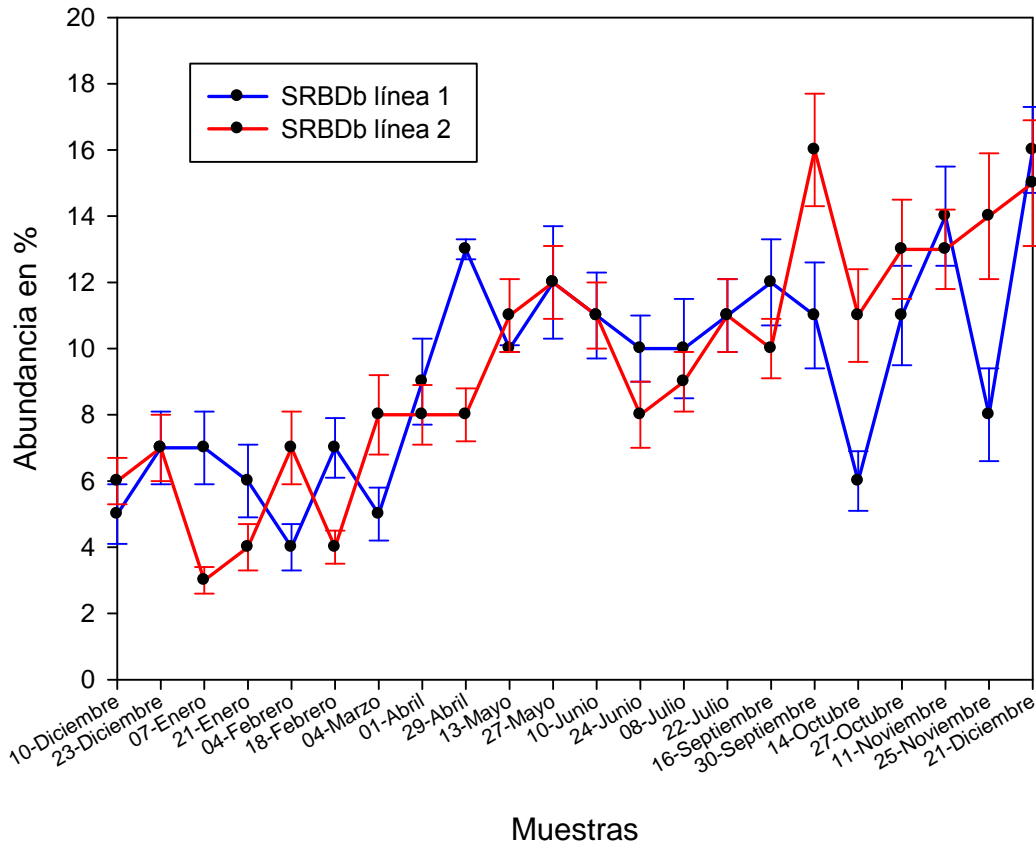


Figura 80. Variación de las SRB hibridadas con la sonda SRB385Db en fangos activos en la EDAR del Carraixet.

En la figura 80 se observa que los comportamientos de la población de SRB entre las líneas son similares. También los porcentajes de abundancia son muy cercanos, a excepción de algunas muestras como las del 29 de abril, 30 de septiembre y 14 de octubre que presentan una diferencia de ~ 5% entre líneas y la muestra 25 de noviembre con una diferencia de ~ 6% entre las dos líneas.

Comparando los resultados de las abundancias de las SRB en cada línea de tratamiento, se puede observar que en la línea 1 las SRB detectadas con la sonda SRB385 son las dominantes entre las muestras 21 de enero hasta el 4 de marzo, mientras que las SRB detectadas con la sonda SRB385Db son dominantes entre las muestras 27 de octubre hasta el 21 de diciembre, es decir que parece que se ha producido un cambio poblacional entre los miembros de este grupo.

En tres de las muestras (23 de diciembre, 4 de febrero y 24 de junio) las abundancias del género *Desulfonema* son las dominantes dentro del grupo de bacterias que se detecta con la sonda SRB385Db.

En la línea 2 las bacterias detectadas con la sonda SRB385 son las dominantes entre las muestras 21 de enero hasta la muestra 18 de febrero, mientras que entre las muestras 27 de octubre hasta la muestra 21 de diciembre son dominantes las bacterias que se detectan con la sonda SRB385Db. En 5 muestras (10 de diciembre, 23 de diciembre, 21 de enero, 18 de febrero y 1 de abril) el género *Desulfonema* es el dominante entre las bacterias que se detectan con la sonda SRB385Db.

De manera general podemos observar que las bacterias que se detectan con SRB385 y SRB385Db tienen comportamientos distintos y se ven favorecidos en distintas etapas del muestreo.

En la figura 81 se puede ver células del género *Desulfonema* hibridadas con la sonda DNMA657. Las hibridaciones se ven claras, con una señal intensa y fácil de distinguir respecto a la señal de fondo.

En la figura 82 y la figura 83 se muestran las bacterias sulfato reductoras, que son hibridadas con las sondas generales para este grupo de bacterias. Todas las hibridaciones de este grupo de bacterias son claras y con buena intensidad de señal, facilitando su visión.

Las SRB presentan forma celular diversa. Estas pueden presentarse en forma de agregados, filamentos, o dispersas en el floculo.

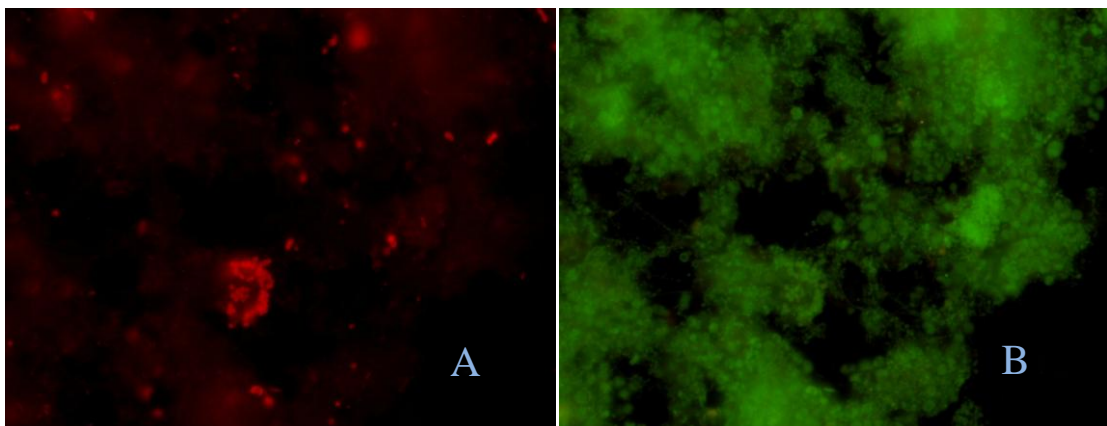


Figura 81. SRB *Desulfonema* presentes en fangos activos en la EDAR del Carraixet. A) Corresponde a bacterias hibridadas con la sonda DNMA657 en Tamra. B) Corresponde a la población general hibridada con la sonda EUBmix+ARCH915 en Fam. 600X.

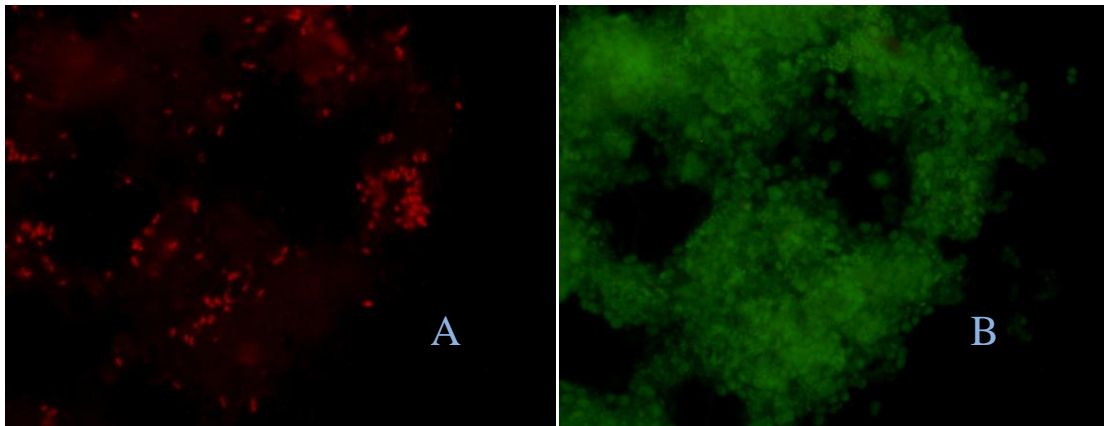


Figura 82. SRB presentes en fangos activos en la EDAR del Carraixet. A) Corresponde a las bacterias hibridadas con la sonda SRB385 en Tamra. B) Corresponde a la población general hibridada con la sonda EUBmix+ARCH915 en Fam. 600X.

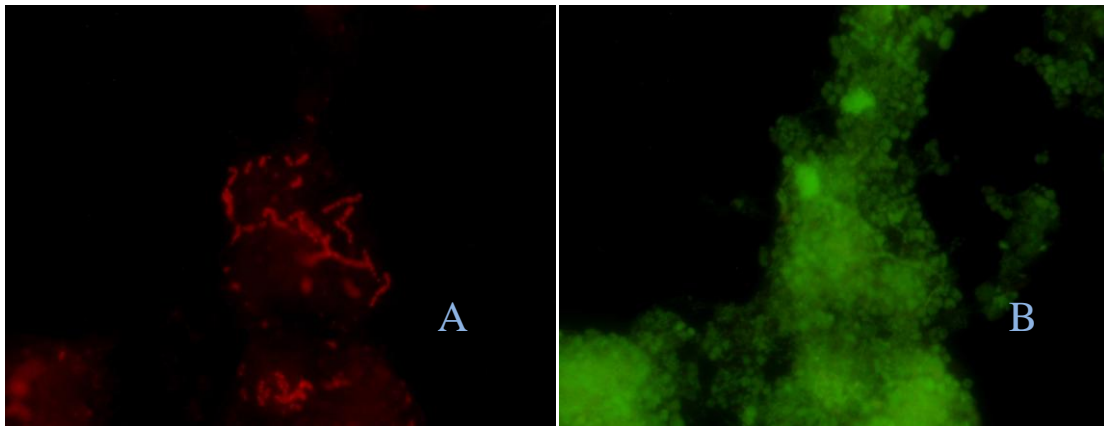


Figura 83. SRB presentes en fangos activos en la EDAR del Carraixet. A) Corresponde a las bacterias hibridadas con la sonda SRB385Db en Tamra. B) Corresponde a la población general hibridada con la sonda EUBmix+ARCH915 en Fam. 600X.

4.4 Dinámica poblacional en cada línea de la EDAR.

En el anexo 2 se muestran las tablas de las cuantificaciones de todas las sondas de phylum y clases utilizadas, junto con sus errores de cuantificación.

Se llegó a cuantificar en promedio un 82% de la población en la línea 1. El promedio de la línea 2 fue del 80%. En el porcentaje de bacterias que no se llegó a identificar y cuantificar, puede estar incluido un porcentaje de bacterias que las sondas utilizadas en esta tesis no hibridaron debido a su especificidad o que presentaban bajo contenido en ribosomas ($<10^3$ / células) en el momento de fijar las muestras.

Sin embargo la variación total de los organismos cuantificados en cada muestra varía mucho. Esto se puede observar en la figura 84 y en la figura 85. En ambas

figuras se representa las poblaciones a nivel de clase y phylum que se cuantificaron. Las bacterias que no se cuantificaron están comprendidas en la división de otros.

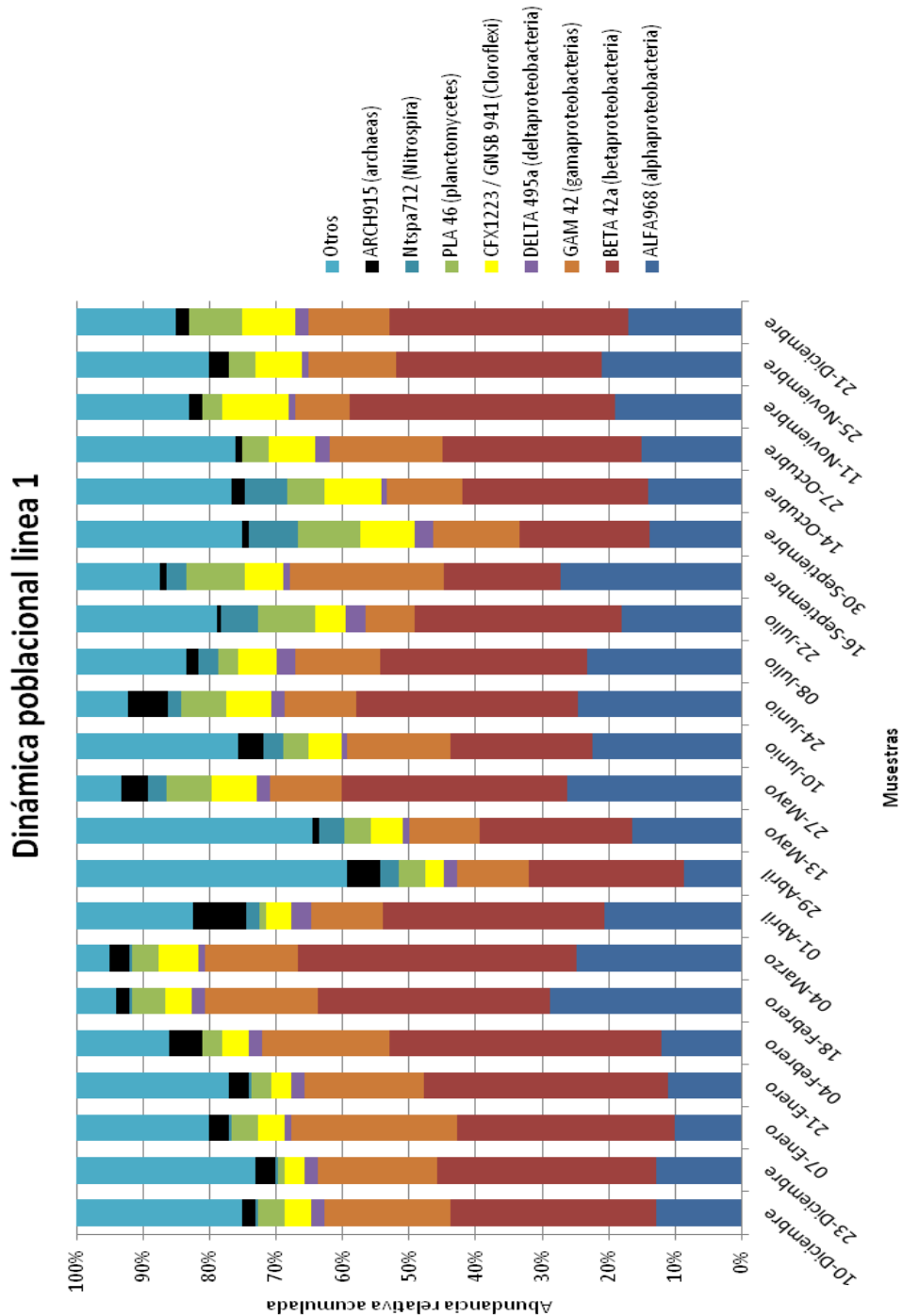


Figura 84. Dinámica poblacional en la línea 1 de la EDAR del Carraixet.

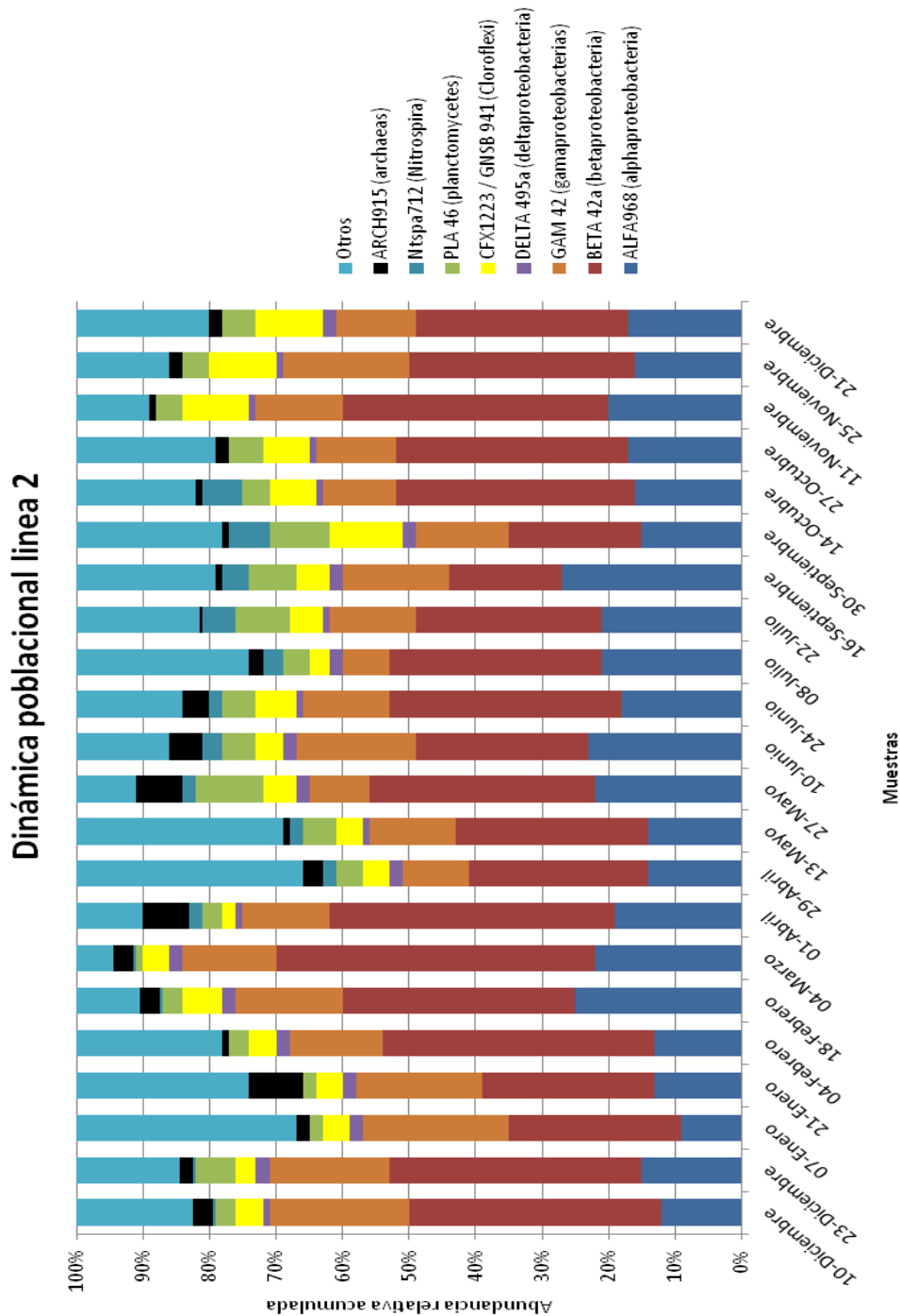


Figura 85. Dinámica poblacional en la línea 2 de la EDAR del Carraixet.

En estas dos imágenes se observa que el phylum dominante en la población Gram negativa es *Proteobacteria*. Este grupo está representado con mayor abundancia por la clase β -*proteobacteria*, seguidas de la α -*Proteobacteria*, las γ -*Proteobacteria* y

por último las δ -*Proteobacteria*. Las clases de *Proteobacteria* están representadas de forma individual para poder analizar mejor los cambios de abundancias dentro de este phylum.

El segundo phylum con mayor presencia es *Chloroflexi* seguido de *Planctomyces*.

Comparando las figuras de la dinámica poblacional en ambas líneas se puede observar, que las muestras 29 de abril y 13 de mayo son donde se registra una menor abundancia total de bacterias hibridadas en ambas líneas y en la muestra del 7 de enero también se detecta muy poca abundancia total hibridada en la línea 2. Observando las tres muestras con las menores abundancias se puede ver una bajada importante de la población de α -*Proteobacteria*, y β -*Proteobacteria*.

En las muestras 18 de febrero, 4 de marzo, 27 de mayo y 24 de junio en la línea 1 se obtienen porcentajes de hibridación más altos de la población, mientras que en la línea 2 los porcentajes más elevados corresponden a las muestras 18 de febrero, 4 de marzo, 1 de abril y 27 de mayo.

Analizando (tablas anexo 2) las poblaciones y sus abundancias en cada muestra se observa que en la muestra 18 de febrero en ambas líneas, la población de α -*Proteobacteria* presenta un aumento importante, mientras que en la muestra 4 de marzo la población en ambas líneas se ve afectada por el aumento considerable de la población de β -*Proteobacteria*.

En la muestra 1 de abril de la línea 2 el porcentaje elevado de abundancia hibridada es debido a las abundancias altas de las poblaciones de β -*Proteobacteria* y arqueas.

La muestra 27 de mayo de la línea 1 es donde se registra una de las mayores abundancias de α -*Proteobacteria*, mientras que en la línea 2 se registra una de las mayores abundancias de α -*Proteobacteria* y arqueas.

En general, en las variaciones de los porcentajes totales de bacterias y arqueas hibridadas en las muestras analizadas, juegan un papel relevante las poblaciones de α -*Proteobacteria* y β -*Proteobacteria*.

Algunas observaciones preliminares con respecto a las poblaciones más abundantes cuantificadas son:

- En las α -*Proteobacteria* se pueden observar las mayores abundancias (superior al 15%) en la muestra 18 de febrero, 4 de marzo y entre las muestras 27 de

mayo hasta la muestras 16 de septiembre. En todas esas muestras la temperatura es superior a 17 °C (tabla de datos operacionales). La población α -*Proteobacteria* pueden verse influenciadas por el aumento de la temperatura.

- Para las β -*Proteobacteria* el comportamiento es diferente que las α -*Proteobacteria*. Las mayores abundancias ($\geq 40\%$) se obtienen en las muestras 4 de febrero, 4 de marzo y 11 de noviembre en ambas líneas. La población tiene una tendencia a disminuir su abundancia entre las muestras 29 de abril hasta el 27 de octubre. Entre esas muestras la temperatura es superior a los 20 °C. Es posible que el aumento de la temperatura afecte a la población β -*Proteobacteria* negativamente.
- En las γ -*Proteobacteria* se observan las mayores abundancias (superior al 15%) en las muestras 10 de diciembre hasta 21 de enero, en las muestras 18 de febrero, 10 de junio y 16 de septiembre en ambas líneas. En la línea 1 también se registra una abundancia alta en las muestras 4 de febrero y 27 de octubre mientras que en la línea 2 en la muestra 25 de noviembre. En las γ -*Proteobacteria* no parece que la temperatura influya directamente sobre la población.
- Las mayores abundancias (mayores del 6%) del phylum *Chloroflexi* se obtiene en las muestras 30 de septiembre hasta 21 de diciembre en ambas líneas. En la línea 1 también hay mayor abundancia en las muestras 27 de mayo y 24 de junio. Este phylum no parece tener relación con la época del año.
- Se ha encontrado abundancias de *Planctomycetes* superiores al 6% en las muestras 27 de mayo, 22 de julio, 16 de septiembre y 30 de septiembre. En la línea 1 también se supera este porcentaje en las muestras 24 de junio y 21 de diciembre. En esta población es posible que la temperatura influya de forma importante.

En la tabla 24 se muestra los promedios de las poblaciones más abundantes halladas en las muestras.

Tabla 24. Promedio de las poblaciones más representativas en la EDAR del Carraixet

Phylum		Promedio de abundancia	
		Linea 1	Linea 2
<i>Proteobacteria</i>	<i>α-proteobacteria</i>	~19	~ 18
	<i>β-proteobacteria</i>	~32	~ 33
	<i>γ-proteobacteria</i>	~15	~ 14
	<i>δ-proteobacteria</i>	~ 2	~ 2
<i>Chloroflexi</i>		~ 6	~ 5
<i>Planctomyces</i>		~ 5	~ 5

El promedio del phylum *Proteobacteria* en la línea 1 es de ~ 68% de abundancia y en la línea 2 del ~67%.

Por otro lado analizando la dinámica de los grupos funcionales a lo largo del muestreo, se puede observar que la población total identificada con las sondas específicas, se sitúan cerca del 50% de la población en ambas líneas. Como se puede observar en la figura 86 y en la figura 87. En ambas líneas las poblaciones más abundantes encontradas son las SRB y las desnitrificantes.

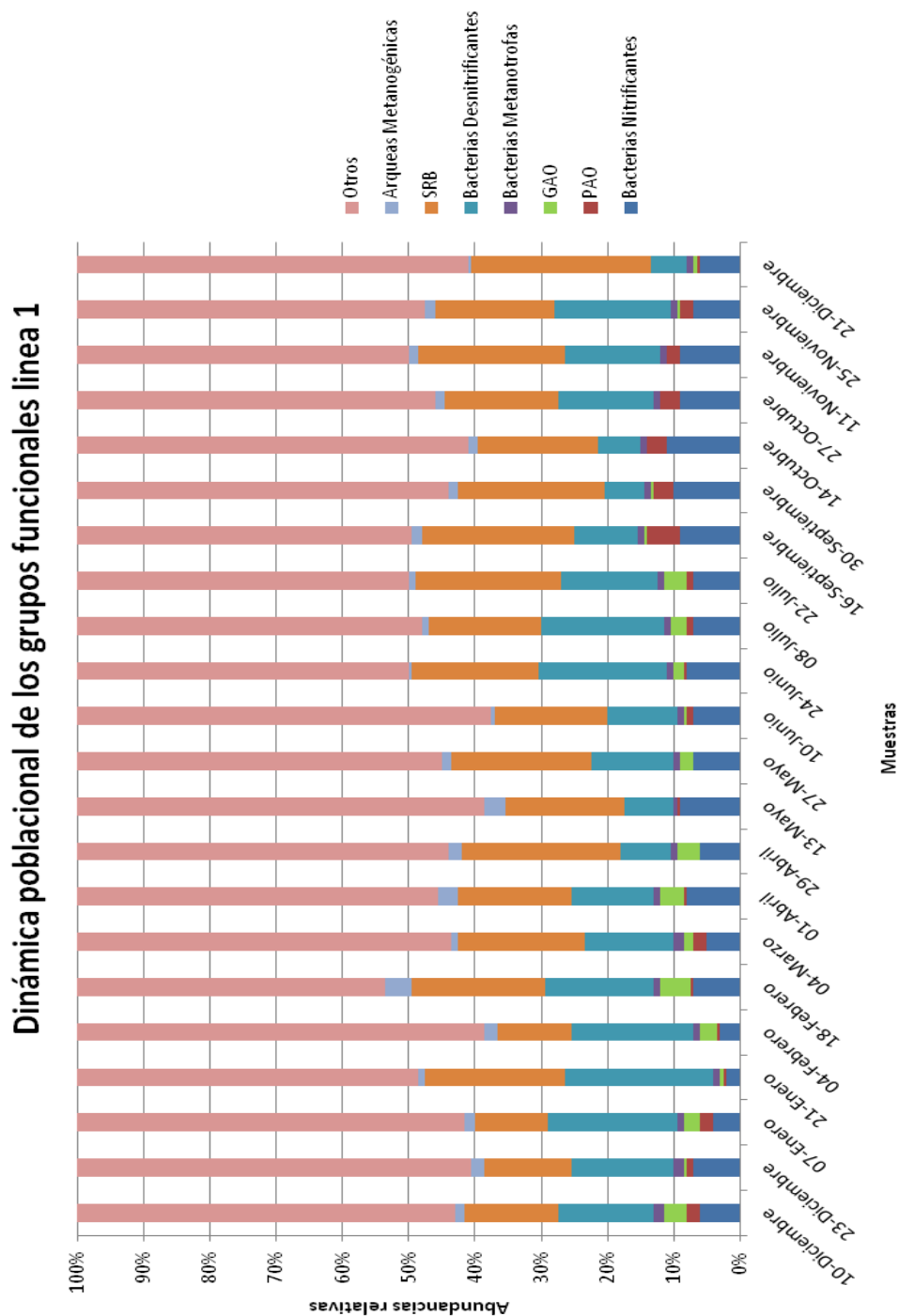


Figura 86. Dinámica poblacional de los grupos funcionales en la línea 1 de la EDAR del Carraixet.

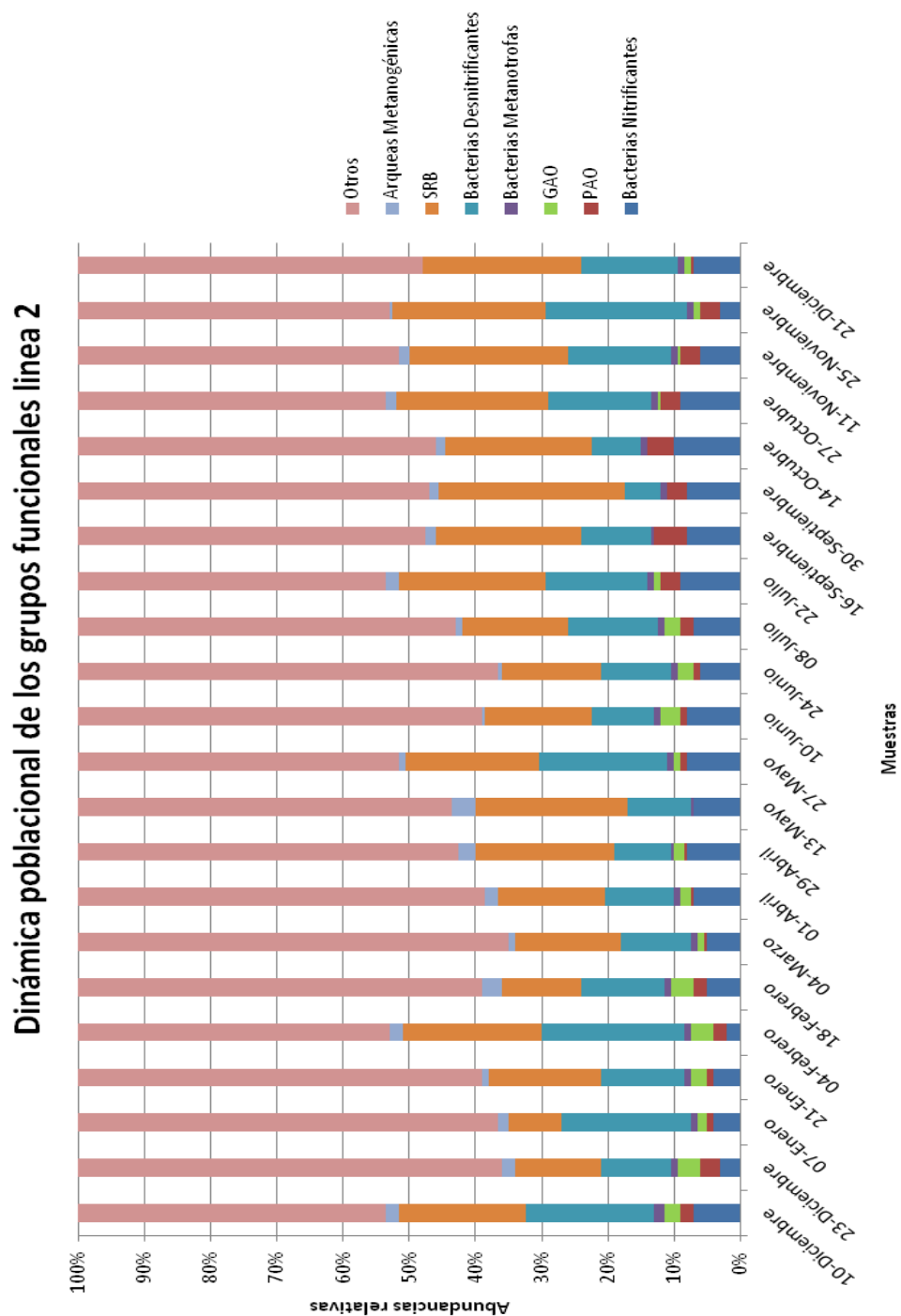


Figura 87. Dinámica poblacional de los grupos funcionales en la línea 2 de la EDAR del Carraixet.

En el grupo de las desnitrificantes, los géneros hallados son bacterias pertenecientes a la clase β -*Proteobacteria*.

El tercer grupo con mayor abundancia determinado en las muestras son las AOB (Nitrificantes).

En el anexo 2 se muestran los resultados y sus errores de cuantificación de todas las sondas utilizadas para la detección de los grupos funcionales.

En las muestras 22 de julio, 16 de septiembre y 30 de septiembre se encuentran las mayores abundancias (superiores al 20%) en ambas líneas para el grupo SRB. En el caso de las desnitrificantes las mayores abundancias (superiores al 15%) en ambas líneas corresponden a las muestras 7 de enero, 4 de febrero y 25 de noviembre.

Las muestras 16 de septiembre, 30 de septiembre, 14 de octubre y 27 de octubre son donde hay mayor abundancia de nitrificantes (superior al 8%).

4.5 Identificación del dominio Eucariota

Protozoos

La identificación de los protozoos en las muestras de la EDAR del Carraixet fue llevado a cabo para la realización de una tesis en paralelo a esta. Por lo que los datos de la población que corresponde a los protozoos fueron proporcionados para incluirlos en los análisis estadísticos realizados en este trabajo.

Para los análisis de las poblaciones de protozoos con las poblaciones de bacterias y arqueas se seleccionaron las poblaciones más representativas que se hallaron.

Los protozoos que se seleccionaron se muestran en la tabla 25, donde se puede apreciar el promedio de la cuantificación de cada población de protozoos de las muestras analizadas. También se detalla la desviación estándar y su error de cuantificación. En el anexo 3 se detallan las cuantificaciones de cada población de protozoos en las distintas muestras analizadas.

Tabla 25. Promedios de la población de Protozoos

Protozoo	Línea 1			Línea 2		
	Promedio	Desviación estándar	Incertidumbre	Promedio	Desviación estándar	Incertidumbre
<i>Peranema Trichophorum</i>	230	313	66	477	620	132
<i>Entosiphon</i>	3316	9448	2014	517	868	185
<i>Arcella sp.</i>	446	646	137	516	975	207
<i>Pyxidicula operculata</i>	154	392	83	831	1889	402
<i>Amoeba < 50 µm</i>	3668	5227	1114	3370	2707	577
<i>Litonotus lamella</i>	46	65	13	81	199	42
<i>Acineta tuberosa</i>	162	212	45	108	123	26
<i>Periacineta sp.</i>	65	99	21	63	86	18
<i>Uronema nigricans</i>	117	148	31	123	180	38
<i>Aspidisca cicada</i>	1928	2348	500	1391	1544	329
<i>Trithigmostoma cucullulus</i>	3	13	2	18	76	16
<i>Euplotes affinis</i>	122	168	35	139	306	65
<i>Pseudochilodopsis fluviatilis</i>	207	503	107	115	226	48
<i>Trochilia minuta</i>	325	500	106	261	551	117
<i>Gastronauta membranaceus</i>	98	176	37	143	253	54
<i>Acinertia uncinata</i>	1557	1444	308	1291	1778	379
<i>Opercularia articulata</i>	186	427	91	167	446	95
<i>Epistylis plicatilis</i>	494	795	169	357	549	117
<i>Epistylis chrysemidis</i>	65	158	33	20	42	9
<i>Epistylis balatonica</i>	267	361	77	141	167	35
<i>Vorticella aquadulcis</i>	1149	897	191	1383	1208	257
<i>Vorticella convallaria</i>	347	516	110	480	869	185
<i>Carchesium polypinum</i>	119	181	38	252	478	101
<i>Opercularia coarctata</i>	213	424	90	202	379	80
<i>Vorticella infusionum</i>	409	1307	278	96	244	52
<i>Vorticella microstoma</i>	102	152	32	207	414	88
<i>Rotaria sp.</i>	86	105	22	77	81	17
<i>Lecane sp.</i>	347	454	96	390	429	91
<i>Nematodo</i>	12	19	4	13	16	3

Hongos

Se encontraron organismos en forma de media luna (elipsoidales) en las muestras. Para la identificación de estos organismos se realizaron hibridaciones con las sondas de cada dominio (Bacteria, Arquea y Eucariota).

Estos organismos hibridaron con la sonda perteneciente al dominio Eucariota (EUK mix). Para la identificación de la posición taxonómica de estos morfotipos celulares dentro de Eucariota también se hibridó con sondas específicas, tales como sondas que identifican algas (Clorofitas y no clorofitas) y levaduras (sonda general de levaduras). Las hibridaciones positivas fueron con la sonda de levaduras (PF2). Estas formas pueden corresponder a conidiosporas de hongos.

Se observaron altas concentraciones en la EDAR del Carraixet en los reactores biológicos de las dos líneas de tratamiento.

En la figura 88 se puede observar estos organismos de forma de media luna encontrados en la EDAR del Carraixet.

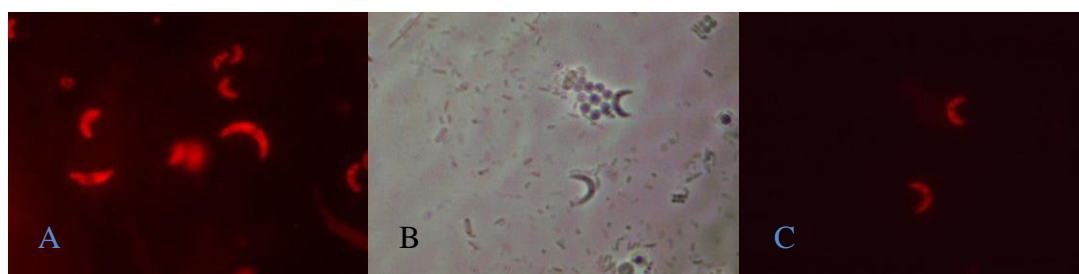


Figura 88. Esporas de hongos encontradas en la EDAR del Carraixet. A) Corresponde a la hibridación de la sonda EUK mix perteneciente al dominio Eucariota. B) Corresponde a la visión en contraste de fases. C) Corresponde a la hibridación con la sonda PF2 perteneciente a Levaduras o ascomicetos. 600X.

Se ha observado que acumulan PHB y presentan actividades exoenzimáticas glucuronidasa y fosfatasa. En la figura 89 se pueden ver a las levaduras en forma de media luna que presentan acumulación de PHB.

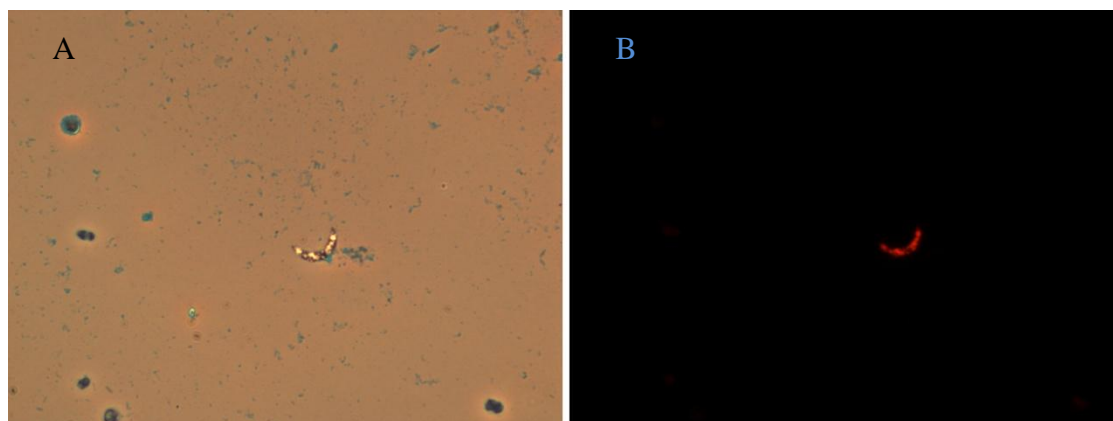


Figura 89. Acumulación de PHB de las esporas de hongos en forma de media luna. A) Contraste de fases. B) Tinción azul de Nilo microscopia de epifluorescencia. 400X.

En la figura 90 se puede ver a las levaduras en forma elipsoidal con tinción Neisser y los sustratos ELF GLU y ELF FOS.

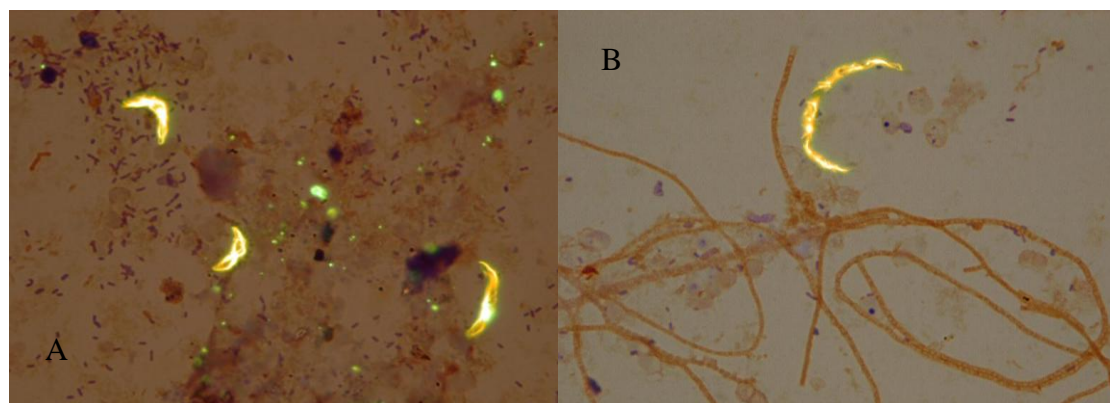


Figura 90. Formas elipsoidales con actividad Glucuronidasa y Fosfatasa. A) Corresponde a tinción Neisser y sustrato ELF GLU. B) Corresponde a tinción Neisser y sustrato ELF FOS. 1000X.

4.6 Estudio estadístico de las relaciones entre bacterias y arqueas con los parámetros físico-químicos, operacionales y protozoos.

Aplicando el análisis de correlación canónico (CCorA) se estudian las correlaciones simultáneas existentes entre las variables y las comunidades de bacterias y arqueas.

Primero se realizó el CCorA para los phylum y clases de bacterias y arqueas junto con las variables operacionales.

En la tabla 26 se pueden ver las correlaciones existentes entre los factores canónicos y las variables originales (variables operacionales y abundancias de bacterias y arqueas).

Tabla 26. Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas

Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas:						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
<i>α-Proteobacteria</i> (Alpha)	-0,413	-0,351	-0,404	-0,279	0,037	0,230
<i>β-Proteobacteria</i> (Beta)	0,547	0,130	0,022	-0,320	0,172	0,072
<i>Chloroflexi</i> (Chlor)	-0,585	0,621	-0,109	0,121	0,175	0,337
<i>γ-Proteobacteria</i> (Gamma)	0,435	0,246	-0,070	0,504	-0,473	-0,227
<i>Planctomycetes</i> (Planc)	-0,667	-0,067	-0,478	0,197	-0,238	-0,149
<i>δ-Proteobacteria</i> (Delta)	0,199	-0,470	0,054	0,224	-0,148	0,736
<i>Nitrospira</i> (Nitro)	-0,749	-0,495	0,170	0,213	-0,037	-0,034
<i>Archaea</i> (Arch)	0,450	-0,434	0,220	0,227	0,520	-0,188
Otros	-0,083	0,172	0,566	-0,114	-0,188	-0,184
Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas:						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Caudal (Q)	-0,005	-0,009	0,290	-0,314	-0,059	-0,902
Oxígeno Disuelto (OD)	0,138	0,082	0,099	0,688	-0,394	0,580
Tiempo de retención hidráulico(TRH)	0,135	0,226	-0,490	-0,493	-0,537	0,399
Temperatura (Temp)	-0,897	-0,254	-0,082	-0,261	-0,202	0,121
Carga másica (Cm)	0,698	-0,473	0,384	-0,176	-0,232	0,238
Edad del fango (EF)	-0,799	0,498	0,139	-0,126	0,265	0,086

F, factor canónico

En la tabla 26, se observa en negrita las variables que están correlacionadas significativamente con los factores canónicos. La gráfica correspondiente al CCorA se puede ver en la figura 91 donde se grafican los primeros factores canónicos (F1 y F2).

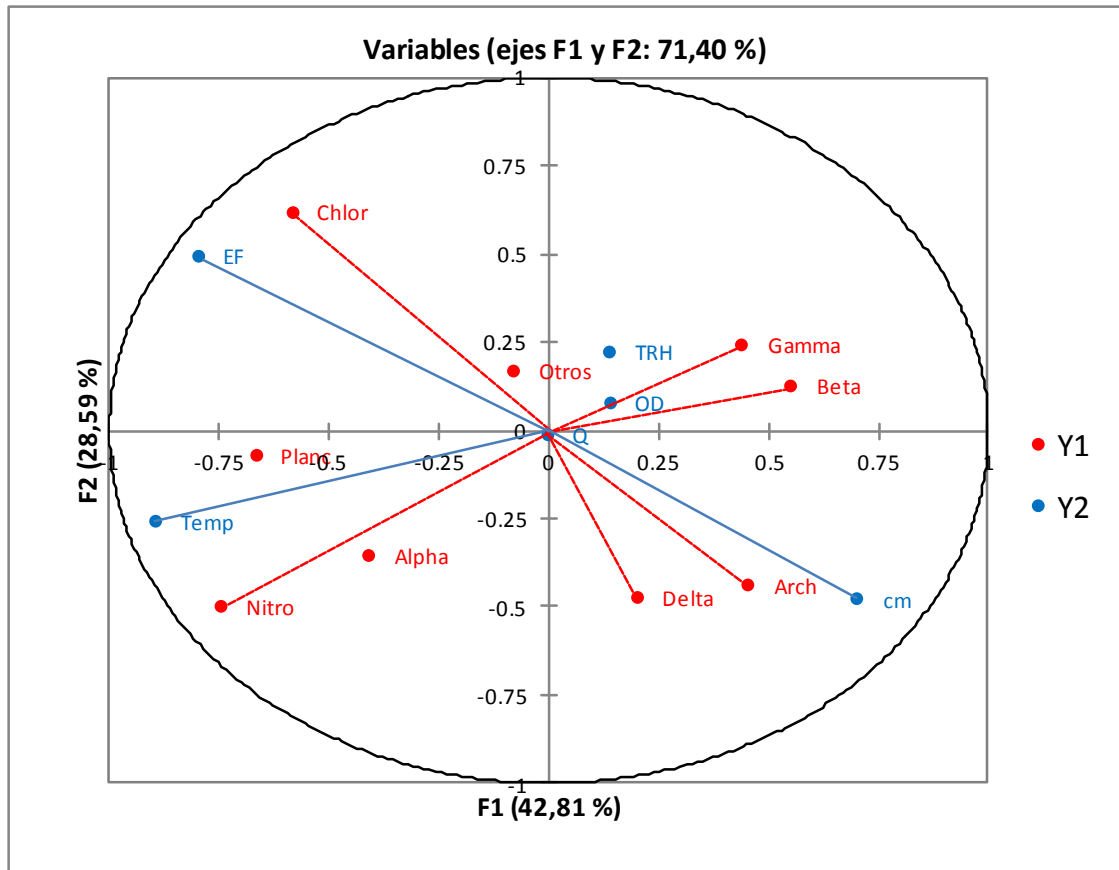


Figura 91. Gráfico de las correlaciones Canónicas entre bacterias, arqueas y variables operacionales.

La interpretación del gráfico y las tablas de correlación del CCorA es la siguiente:

- Se explica un 71,40% de la varianza de los datos de las cuales el 42,81% lo explica F1 (factor canónico 1).
- F1 (factor canónico 1 de la tabla 26) correlaciona negativamente con las variables temperatura y edad de fango, también correlaciona positivamente con la variable carga másica. F1 correlaciona positivamente con β -Proteobacteria y correlaciona negativamente con las comunidades de *Planctomycetes*, *Chloroflexi* y *Nitrospira*.

- Existe correlación positiva entre las *Chloroflexi* y F2 (factor canónico 2 de la tabla 26).
- F4 (factor canónico 4 de la tabla 26) esta correlacionado positivamente con el oxígeno disuelto y las γ -*Proteobacteria*.
- F5 (factor canónico 5 de la tabla 26) muestra una correlación positiva con las arqueas y negativa con el tiempo de retención hidráulico.
- En F6 (factor canónico 1 de la tabla 26) se puede ver una correlación negativa con el caudal y positiva con las δ -*Proteobacteria* y el oxígeno disuelto.

En base a los resultados obtenidos con el CCorA (F1) observamos que temperaturas y edades del fango altas se correlacionan positivamente con el aumento de las poblaciones de *Chloroflexi*, *Planctomycetes* y *Nitrospira*. Sin embargo las altas temperaturas y edades de fango se correlacionan negativamente con la abundancia de las β -*Proteobacteria*. El aumento de la carga másica correlaciona positivamente con las abundancias de las β -*Proteobacteria*, pero negativamente en las comunidades de *Chloroflexi*, *Planctomyces* y *Nitrospira*. También parece tener relación el aumento de la abundancia de las γ -*Proteobacteria* con un alto oxígeno suministrado. El aumento del tiempo de retención hidráulico se correlaciona negativamente con las abundancias de las arqueas.

Se realizó un análisis de correspondencia (AC) para representar la interdependencia de las comunidades con las variables en estudio (figura 92).

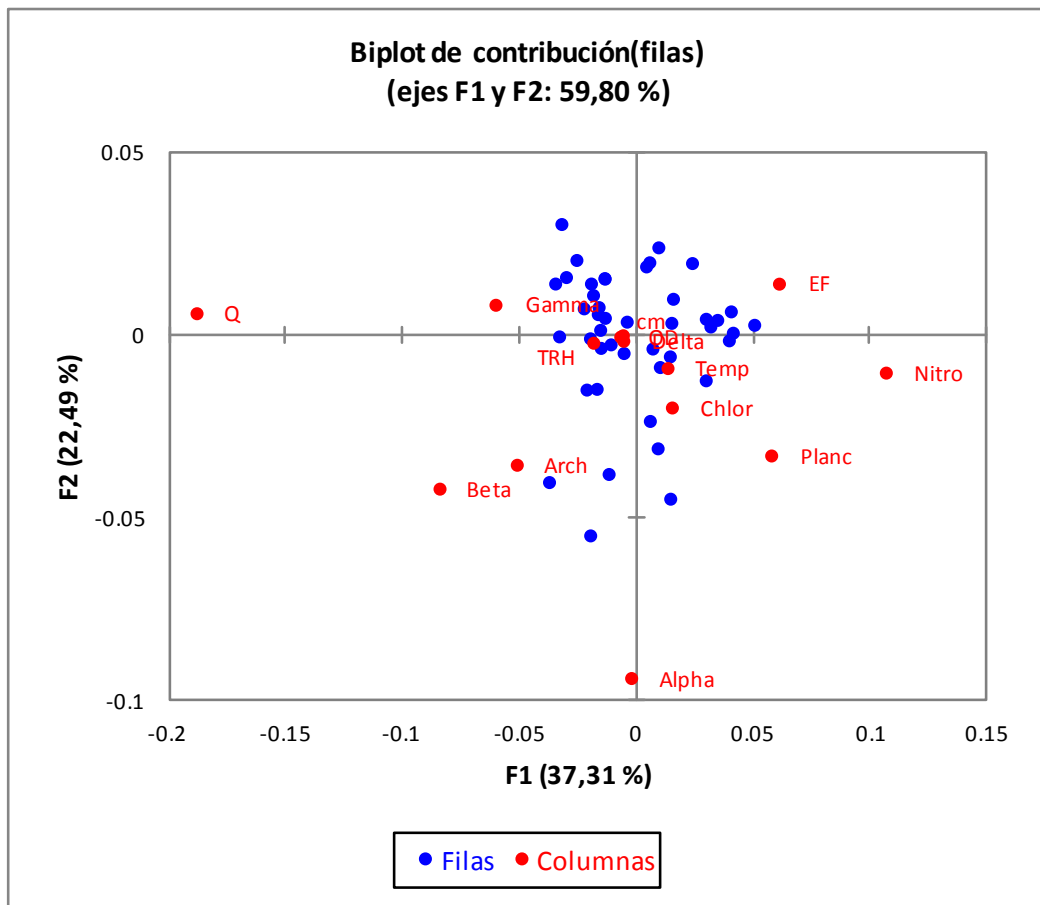


Figura 92. Análisis de correspondencia entre los phylum y las variables operacionales.

En las figuras correspondientes a los análisis AC se representa a las variables como columnas y en rojo mientras que las muestras (44 en total) se representan en filas y con color azul. Los colores son por defecto del programa utilizado.

En base a los resultados del AC y su representación gráfica se observa que las poblaciones de *Chloroflexi*, *Planctomycetes* y *Nitrospira* tienen interdependencia con la temperatura, también que las δ -*Proteobacteria* pudieran tener interdependencia con la carga másica, oxígeno disuelto y el tiempo de retención hidráulico. Con el AC se explica el 59.80% de la inercia. Con el objeto de saber entre que variables y comunidades existe relación directa se procede a realizar el análisis de correspondencia canónica (ACC). La restricción para su análisis correcto es que las variables estén linealmente relacionadas con las abundancias.

En la tabla 27 se puede ver la descomposición de la inercia total en dos partes, la parte restringida que es donde el ACC busca las soluciones donde están linealmente relacionadas las variables con las comunidades y la no restringida donde el AC busca las soluciones de interdependencia, el AC explica la máxima inercia. Siempre es mayor la inercia no restringida, sin embargo en los estudios medioambientales un alto

porcentaje de la inercia es restringida. En este caso la inercia restringida es un 42.8% de la inercia total. Es decir puede haber otras variables que tengan relación directa con las abundancias de las comunidades a parte de la temperatura.

Tabla 27. Partición de la inercia explicada

Inercia:		
	Valor	%
Total	0,063	100,000
Restringida	0,027	42,872
No-restringida	0,036	57,128

La representación de los resultados obtenidos con ACC para los phylum y las variables operacionales se indica en la figura 93.

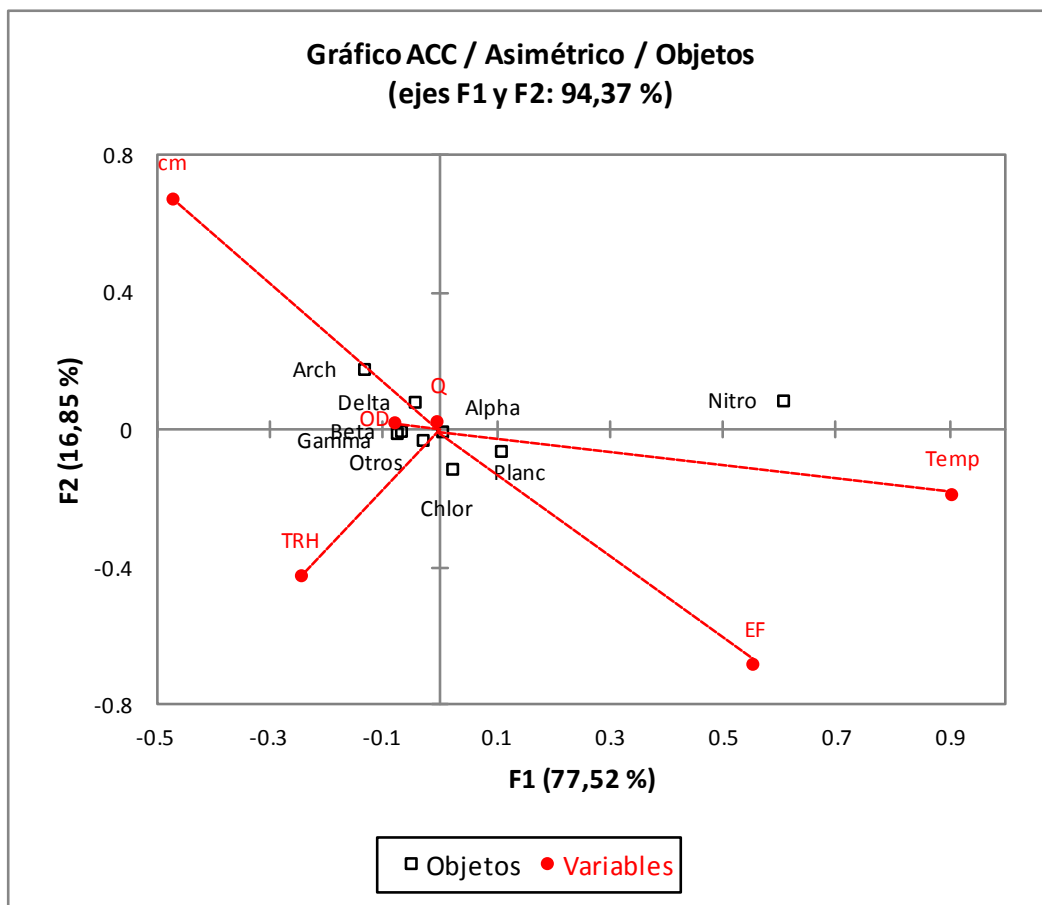


Figura 93. Análisis de correspondencia canónico de las comunidades de bacterias y arqueas con las variables operacionales.

Para analizar la representación gráfica del ACC debemos tener en cuenta el largo del vector de las variables. Este corresponde a la significancia que tiene esta variable en relación a los cambios de abundancia de cada comunidad. La posición del vector con respecto a los ejes corresponde a la aportación de esta variable a los cambios en las comunidades y la posición de las comunidades con respecto a los vectores de las variables que corresponde a la respuesta de las poblaciones a la variable.

Analizando el gráfico del ACC (figura 93) se puede observar que la variable que más significancia tiene con respecto a las abundancias de las poblaciones es la temperatura, seguida de la edad de fango, carga másica y por último el tiempo de retención hidráulico. La variable temperatura está asociada a F1 en la parte positiva y negativa a F2. La edad del fango está asociada a los dos factores, la parte positiva de F1 y la negativa de F2. Las bacterias del phylum *Planctomycetes* están más próximas a la parte positiva del F1 y se asociaría con altas temperaturas. Las bacterias del phylum *Chloroflexi* están más próximas a la parte negativa del F2, por lo que las edades de fango elevadas favorecen su desarrollo. La carga másica está asociada a la parte negativa de F1 y a la positiva de F2, mientras que las comunidades de arqueas y δ -*Proteobacteria* están sobre la línea de la carga másica por lo que se puede interpretar que dependen de esta variable.

Se realizaron los mismos análisis estadísticos para conocer la correlación, interdependencia y la relación directa existente para las variables físico-químicas.

En la tabla 28 se muestran las correlaciones entre los factores canónicos y las variables iniciales obtenidos con el CCorA.

Tabla 28. Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas.

Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas:						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
<i>α-Proteobacteria</i> (Alpha)	-0,260	0,529	-0,008	-0,300	0,006	-0,205
<i>β-Proteobacteria</i> (Beta)	-0,371	-0,009	-0,080	0,697	0,052	0,001
<i>Chloroflexi</i> (Chlor)	-0,559	0,275	-0,045	-0,525	0,155	-0,250
<i>γ-Proteobacteria</i> (Gamma)	0,246	0,423	0,359	0,212	0,259	0,248
<i>Planctomycetes</i> (Planc)	-0,025	-0,017	0,541	-0,671	0,105	0,144
<i>δ-Proteobacteria</i> (Delta)	0,647	0,284	-0,394	-0,114	-0,369	0,110
<i>Nitrospira</i> (Nitro)	0,170	0,007	0,052	-0,245	-0,125	0,099
<i>Archaea</i> (Arch)	-0,150	0,088	0,086	0,344	-0,849	0,116
Otros	0,446	-0,588	-0,023	-0,096	-0,026	-0,383
Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas:						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
pH	-0,422	0,603	0,399	-0,260	0,196	0,440
Conductividad (Cond)	0,021	0,664	0,481	0,061	-0,444	-0,356
Nitrógeno total (NT)	0,203	-0,330	0,797	0,287	-0,346	-0,115
Fósforo total (PT)	-0,212	-0,587	0,600	0,360	-0,135	-0,322
DQOT	-0,357	-0,479	0,616	0,216	-0,464	-0,039
Sólidos suspendidos volátiles (SSV)	-0,406	-0,458	0,627	-0,026	-0,467	-0,116

F, factor canónico

En esta tabla 28 se puede observar en negrita las variables que correlacionan significativamente con los factores canónicos. La representación gráfica de los resultados del análisis CCorA se muestra en la figura 94.

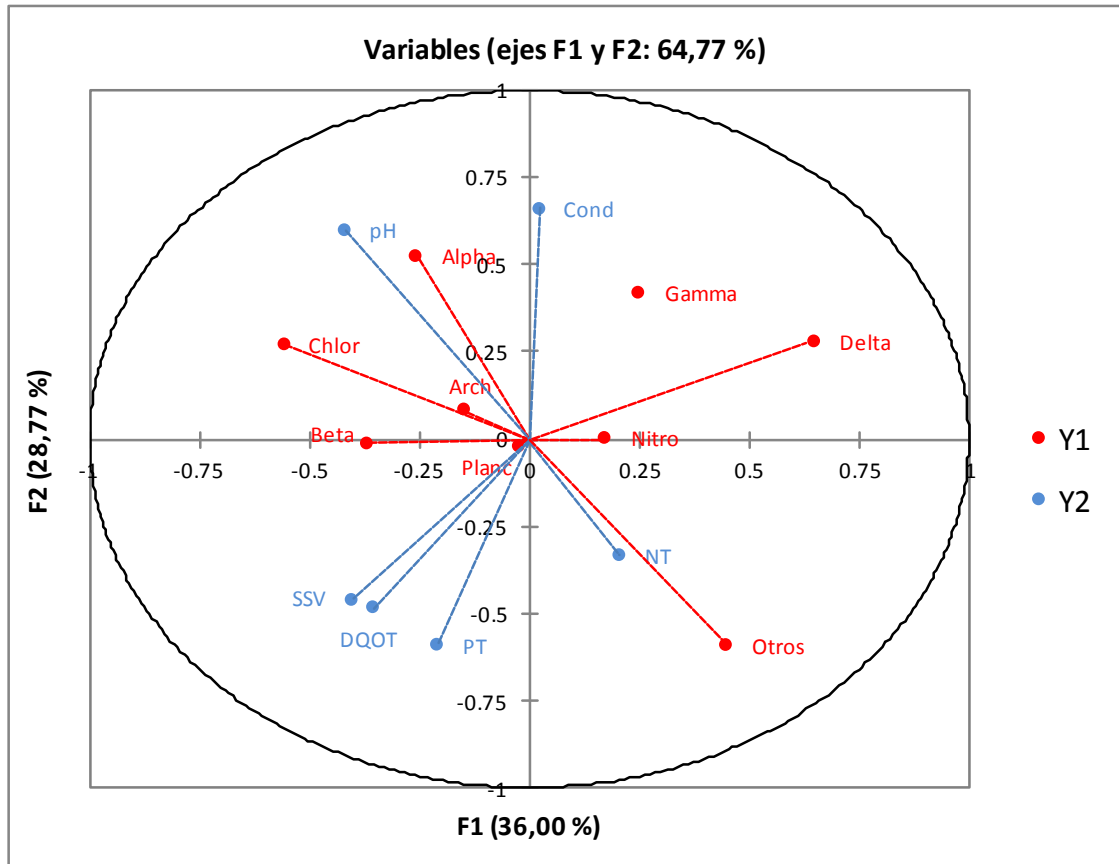


Figura 94. Gráfico de las correlaciones Canónicas entre bacterias, arqueas y variables físico-químicas.

La interpretación de la tabla y el Gráfico de CCorA para las variables físico-químicas sería:

- Entre los factores 1 y 2 se explica un 64,77% de la varianza, con estos dos factores se explica la mayoría de las correlaciones, sin embargo en F3 y F4 se observa buena correlación con varias variables.
- Observando F1 (factor canónico 1 tabla 28) se ve una correlación positiva con *δ-Proteobacteria* y una correlación negativa con *Chloroflexi*.
- En F2 (factor canónico 2 tabla 28) se ve correlación positiva con pH, conductividad y las *α-Proteobacteria*, mientras una correlación negativa con el fósforo total y la división de otros.
- F3(factor canónico 3 tabla 28) correlaciona positivamente con las variables nitrógeno total, fósforo total, DQO total y SSV, además con la comunidad de *Planctomycetes*.

- En F4 (factor canónico 1 tabla 28) también se explica una correlación entre las comunidades de bacterias, esta es una correlación positiva con *β -Proteobacteria* y negativa con *Chloroflexi* y *Planctomyces*.

En resumen podemos observar que las *α -Proteobacteria* y *Planctomycetes* son las comunidades que más se correlacionan con las variables físico-químicas. Las abundancias de *α -Proteobacteria* se correlacionan positivamente con el aumento del pH y la conductividad, mientras tiene una correlación negativa con el fósforo total. El aumento de la abundancia de las *α -Proteobacteria* correlaciona negativamente con la abundancia de otros (no identificada). Con respecto a las *Planctomycetes* se correlacionan positivamente con altas concentraciones de nitrógeno total, fósforo total, DQO total y SSV.

Al comparar los dos análisis CCorA con referente a las comunidades de bacterias y arqueas podemos observar que las abundancias de *β -Proteobacteria* correlacionan negativamente con las poblaciones de *Chloroflexi* y *Planctomycetes*.

Para conocer la interdependencia de las comunidades con las variables físico-químicas, se realizó el AC correspondiente. Los resultados se expresan en su representación gráfica Biplot (figura 95).

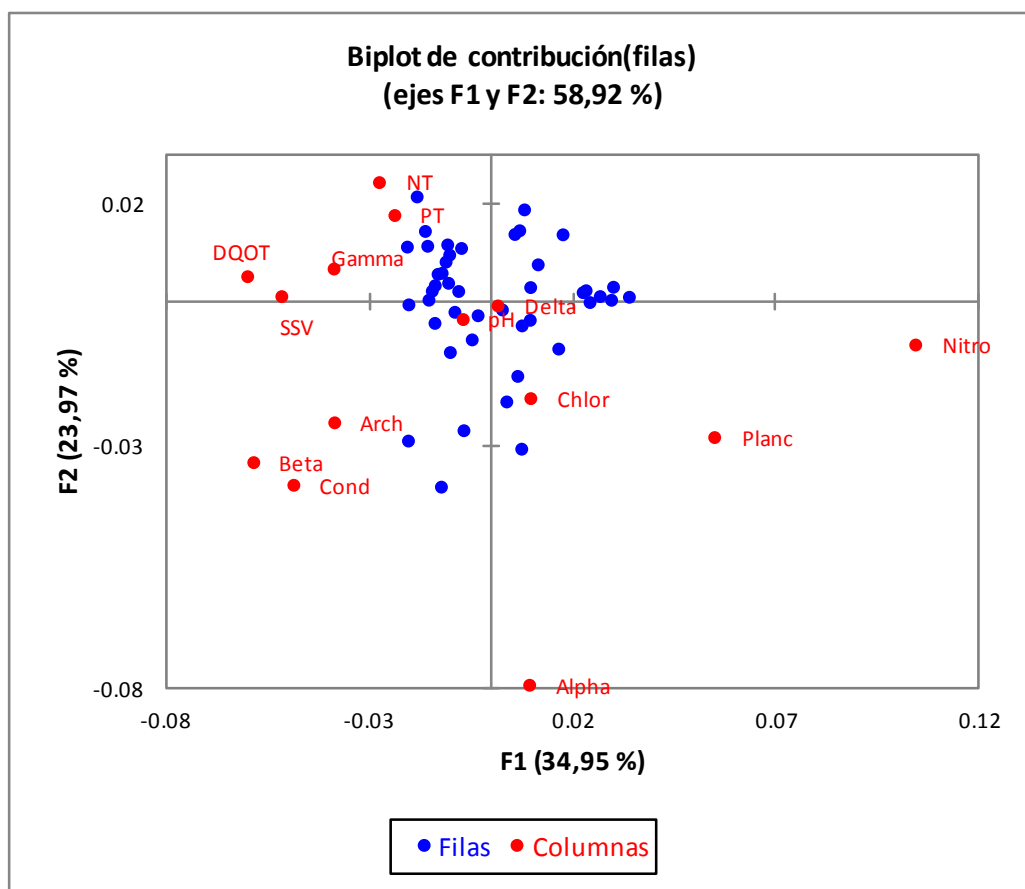


Figura 95. Análisis de correspondencia para las comunidades de bacterias y arqueas y variables físico-químicas.

Las γ -Proteobacteria se relacionan con la DQO total, SSV, nitrógeno total y fósforo total. Las arqueas y las β -Proteobacteria se asocian con la conductividad.

Con los análisis AC también se puede observar en qué muestras se relacionan o se asocian las mayores abundancias de cada comunidad de bacterias o arquea, para ello nos basamos en el Biplot de contribución columnas (figura 96).

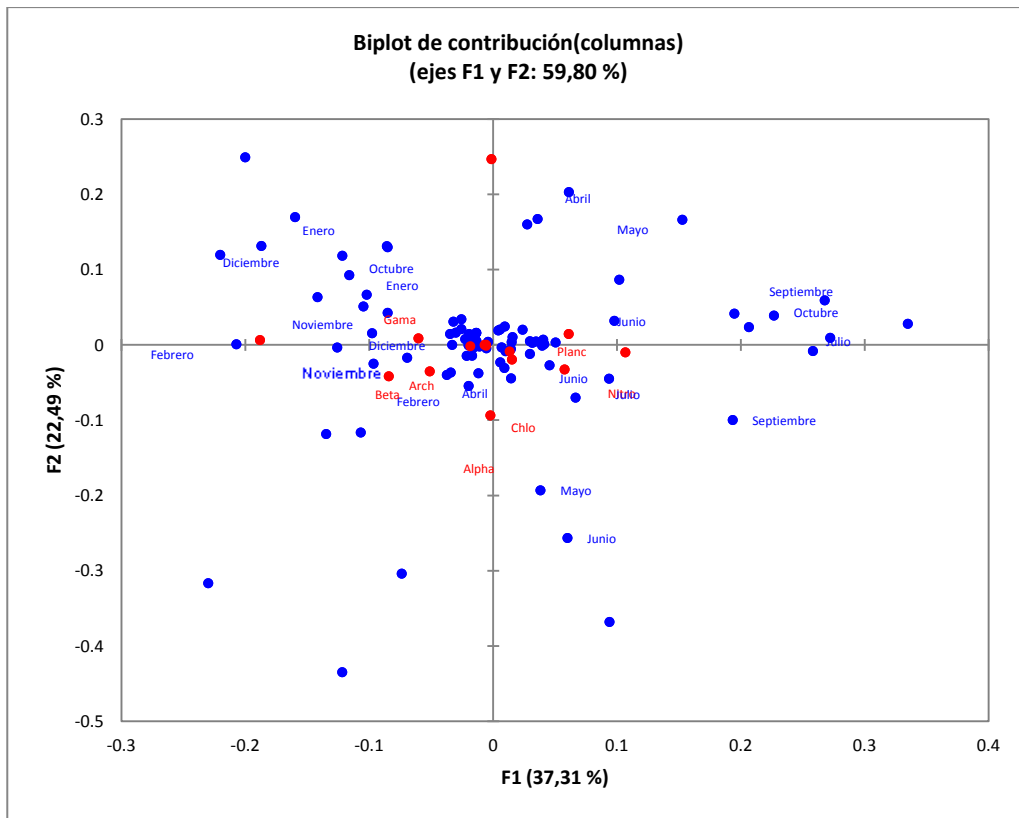


Figura 96. Biplot de las comunidades de bacterias y arqueas con contribución a las columnas.

Analizando el Biplot de la figura 96 (Biplot con contribución a las filas) podemos observar que las γ -Proteobacteria son interdependientes a los meses diciembre y enero. Las arqueas y las β -Proteobacteria son interdependientes a los meses de febrero y abril. Las *Chloroflexi*, *Planctomycetes* y *Nitrospira* son interdependientes con los meses mayo, junio y julio.

En la tabla 29 se observa la parte de la inercia que se explica con el AC, el porcentaje es 89,4%. El porcentaje que explica el AC es alto, el porcentaje restante de la inercia total se explica con un ACC.

Tabla 29. Partición de la inercia explicada

Inercia:		
	Valor	%
Total	0,063	100,000
Restringida	0,007	10,556
No-restringida	0,056	89,444

En la figura 97 se representa el resultado del ACC llevado a cabo para las variables físico-químicas.

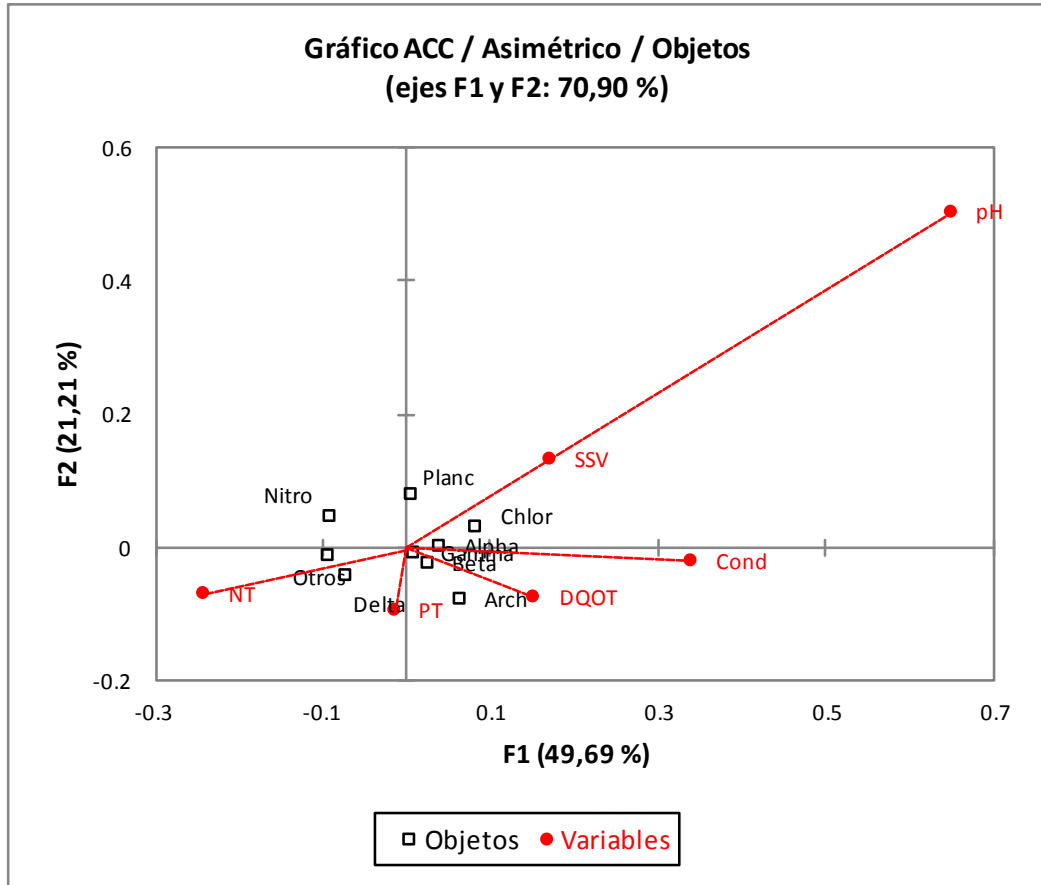


Figura 97. Análisis de correspondencia canónica para las comunidades de bacterias y arqueas con las variables físico-químicas.

La variable que más significancia tiene para las comunidades es el pH seguida de la conductividad. Las *Chloroflexi* y *Planctomyces* junto con pH y SSV se encuentran entre la parte positiva de F1 y F2. Las arqueas, *β -Proteobacteria*, conductividad y DQO total se encuentran en la parte positiva de F1 y negativa del F2. Las *δ -Proteobacteria* y el nitrógeno total están en la parte negativa de F1 y de F2.

A pesar de estos resultados, el ACC según la prueba de permutación resultaron no estar relacionadas linealmente las poblaciones de bacterias y arqueas con las variables físico-químicas.

Para conocer las posibles correlaciones, interdependencias y las relaciones directas que pudieran tener los grupos funcionales con las variables tanto

operacionales como físico-químicas, se realizaron los estadísticos CCorA, AC y ACC como se realizó para las comunidades de bacterias y arquea.

En la tabla 30, se observan las correlaciones obtenidas con el CCorA entre las variables de entrada (grupos funcionales y variables operacionales) y los factores canónicos hallados.

Tabla 30. Correlaciones entre las variables de entrada y variables canónicas

Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas:						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
AOB	0,397	-0,315	-0,093	-0,582	-0,106	0,374
PAO	0,101	-0,292	-0,188	-0,215	0,439	-0,386
GAO	-0,196	-0,207	0,777	0,293	0,300	-0,092
TFO	-0,099	-0,076	0,518	-0,122	-0,282	-0,570
Metanotrofas	0,165	0,153	0,552	-0,148	-0,030	-0,408
Desnitrificantes	-0,090	0,512	0,589	0,145	0,308	-0,161
SRB delta	-0,543	0,497	0,287	-0,097	0,049	0,088
SRB385	0,010	-0,029	-0,348	-0,413	0,237	-0,007
SRB385Db	0,363	0,478	-0,581	-0,032	0,043	-0,019
Metanogenicas	-0,162	-0,344	0,168	0,255	-0,375	0,157
Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas:						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Caudal (Q)	0,002	-0,287	-0,493	-0,128	-0,357	0,728
Oxígeno disuelto (OD)	0,052	0,363	0,750	0,094	0,543	-0,012
Tiempo de retención hidráulico (TRH)	-0,028	0,226	-0,028	0,933	-0,108	-0,256
Temperatura (Temp)	-0,601	-0,407	-0,387	0,231	0,484	-0,188
Carga másica (Cm)	-0,205	-0,092	0,747	0,125	-0,593	0,155
Edad del fango (EF)	0,277	-0,521	-0,473	0,006	0,606	-0,248

F, factor canónico

En la figura 98 se muestra la representación gráfica de las correlaciones existentes entre los grupos funcionales y las variables operacionales.

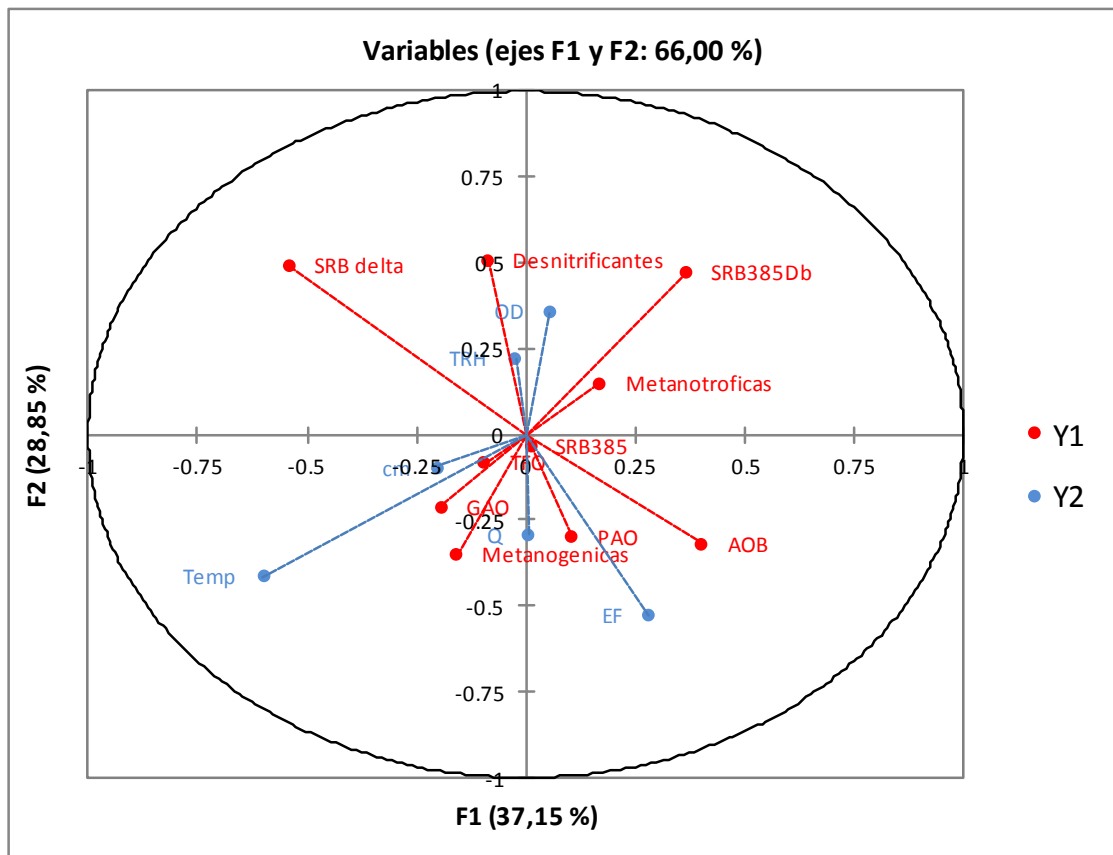


Figura 98. Gráfico de las correlaciones Canónicas entre las poblaciones de los grupos funcionales y las variables operacionales.

La interpretación del CCorA es:

- Con los factores 1 y 2, se explica el 66% de la. Según la tabla 30 el F3 tiene buena correlación con varias variables.
- F1 (factor canónico 1 de la tabla 30) tiene correlación negativa con la población de SRB perteneciente a las δ -Proteobacteria y la temperatura.
- F2 (factor canónico 2 de la tabla 30) tiene correlación positiva con la población de desnitrificantes y correlación negativa con la edad de fango.
- F3 (factor canónico 3 de la tabla 30) tiene correlación positiva con las poblaciones de GAO, TFO, metanotroficas y las desnitrificantes, al igual que con las variables oxígeno disuelto y carga másica y correlación negativa con las bacterias que se hallan con la sonda SRB385Db.

- F4 (factor canónico 4 de la tabla 30) tiene correlación positiva con el tiempo de retención hidráulico y correlación negativa con la población de AOB.

De forma general vemos una correlación favorable entre las abundancias de las SRB δ -*Proteobacteria* y la temperatura; una correlación inversa entre las abundancias de las desnitrificantes y la edad de fango, es decir esta variable no favorece a la abundancia de las desnitrificantes. Las poblaciones GAO, TFO, metanotrofas y desnitrificantes se favorecen con el oxígeno disuelto y la carga másica, pero estas variables no favorecen la abundancia de las bacterias detectadas con la sonda SRB385Db. Por último la población de las AOB no se ve favorecida con el tiempo de retención hidráulico.

Para conocer la interdependencia entre los grupos funcionales y las variables operacionales se llevó a cabo el AC correspondiente. En la figura 99 se puede ver la representación gráfica de los resultados del AC.

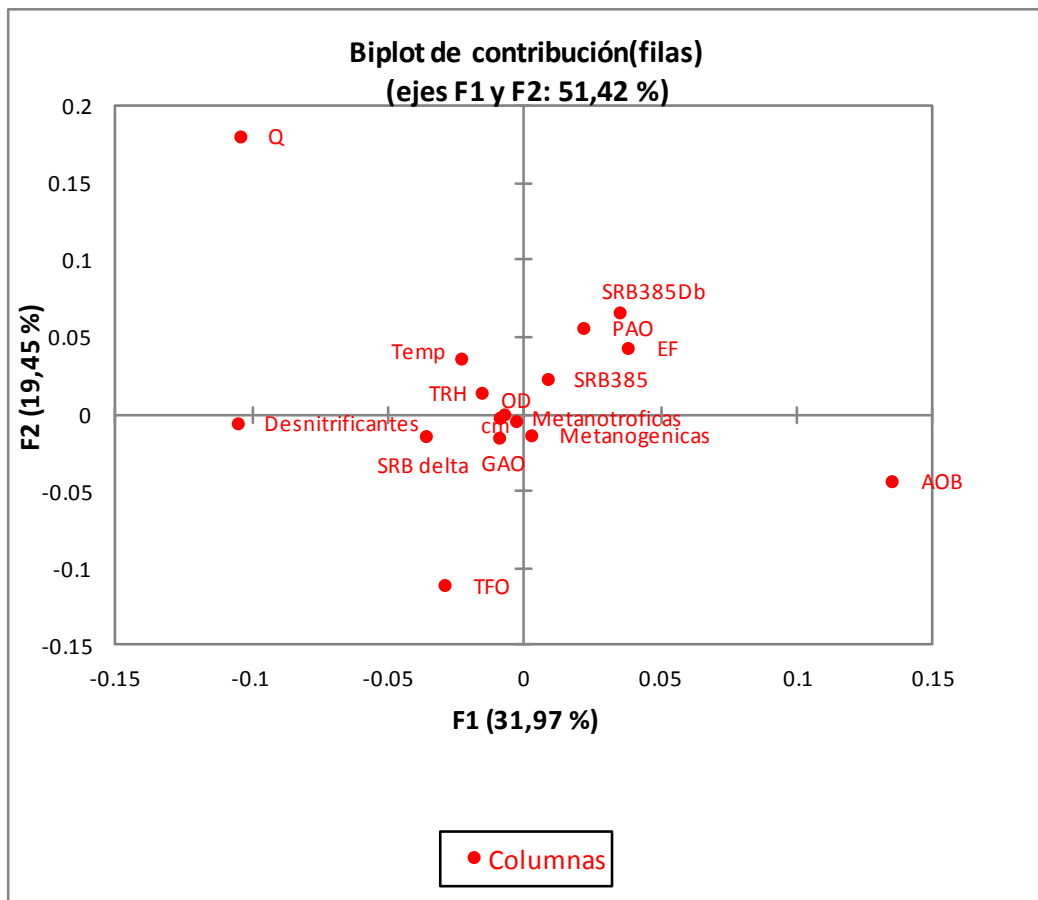


Figura 99. Análisis de correspondencia de los grupos funcionales y las variables operacionales.

Las comunidades PAO y las bacterias detectadas con la sonda SRB385Db tienen interdependencia con la edad de fango, mientras que las GAO, metanotrofas y las metanogénicas parecen tener interdependencia con el oxígeno disuelto y la carga másica.

En la tabla 31 se detalla la inercia no restringida explicada con el AC (86,7%), el restante (inercia restringida) se explica con el ACC.

Tabla 31. Partición de la inercia explicada

Inercia:		
	Valor	%
Total	0,130	100,000
Restringida	0,017	13,253
No-restringida	0,113	86,747

En la figura 100 se puede ver la representación gráfica del ACC. Se puede ver que la variable carga másica tiene más significancia en los grupos funcionales seguida por la edad de fango y el tiempo de retención hidráulico.

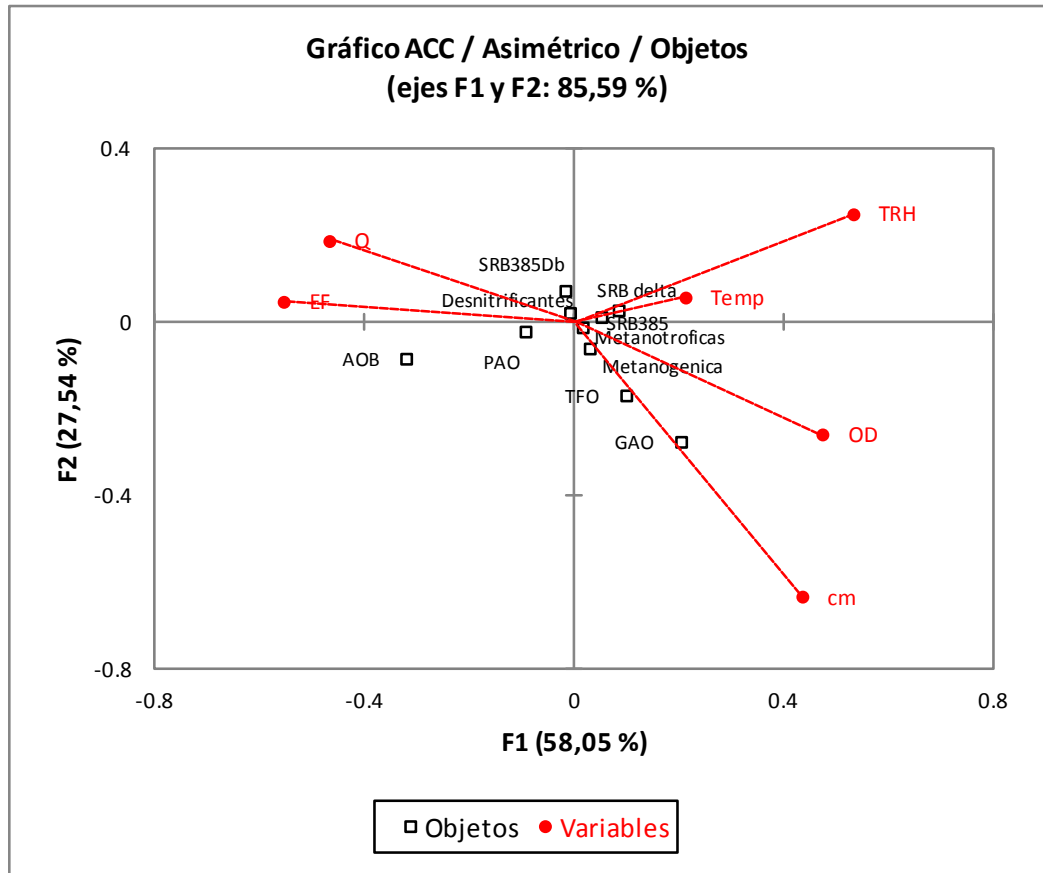


Figura 100. Analisis de correspondencia Canónico de los grupos funcionales y las variables operacionales.

Las poblaciones bacterianas de los diferentes grupos funcionales (SRB, AOB, desnitrificantes, GAO, PAO, TFO metanotróficas y metanogénicas) no resultaron estar directamente relacionadas con las variables operacionales según la prueba de permutación.

Se aplicaron los análisis CCorA, AC y ACC para establecer las correlaciones, interdependencia y relación directa de los grupos funcionales con las variables físico-químicas.

En la tabla 32 se pueden ver los resultados del CCorA realizado para los grupos funcionales y las variables físico-químicas.

Tabla 32. Correlación entre variables de entrada y variables canónicas

Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas (Y1):						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
AOB	0,555	-0,442	0,382	0,369	-0,101	-0,169
PAO	0,558	0,233	0,028	-0,521	-0,027	0,166
GAO	-0,658	-0,191	0,523	-0,353	0,284	0,172
TFO	-0,564	-0,280	0,220	0,224	-0,236	0,213
Metanotroficas	-0,148	0,065	-0,107	-0,214	0,465	-0,178
Desnitrificantes	-0,561	-0,140	-0,159	-0,446	-0,175	-0,099
SRB delta	-0,302	-0,630	-0,539	-0,186	0,172	0,230
SRB385	0,147	-0,004	0,244	-0,133	-0,036	-0,693
SRB385Db	0,616	-0,385	-0,290	0,267	0,200	0,047
Metanogenicas	-0,374	0,267	0,329	0,297	0,174	-0,046
Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas (Y2):						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
pH	-0,138	-0,543	-0,656	-0,473	0,002	-0,179
Conductividad (Cond)	-0,560	0,050	-0,338	-0,197	-0,693	0,226
Nitrógeno total (NT)	-0,354	0,824	-0,154	-0,365	0,037	0,192
Fósforo total (PT)	0,089	0,822	0,136	-0,542	-0,066	-0,028
DQOT	0,196	0,691	-0,180	-0,597	-0,046	0,305
Sólidos suspendidos volátiles (SSV)	0,295	0,691	-0,346	-0,499	-0,150	0,210

F, factor canónico

La representación gráfica del CCorA se puede observar en la figura 101.

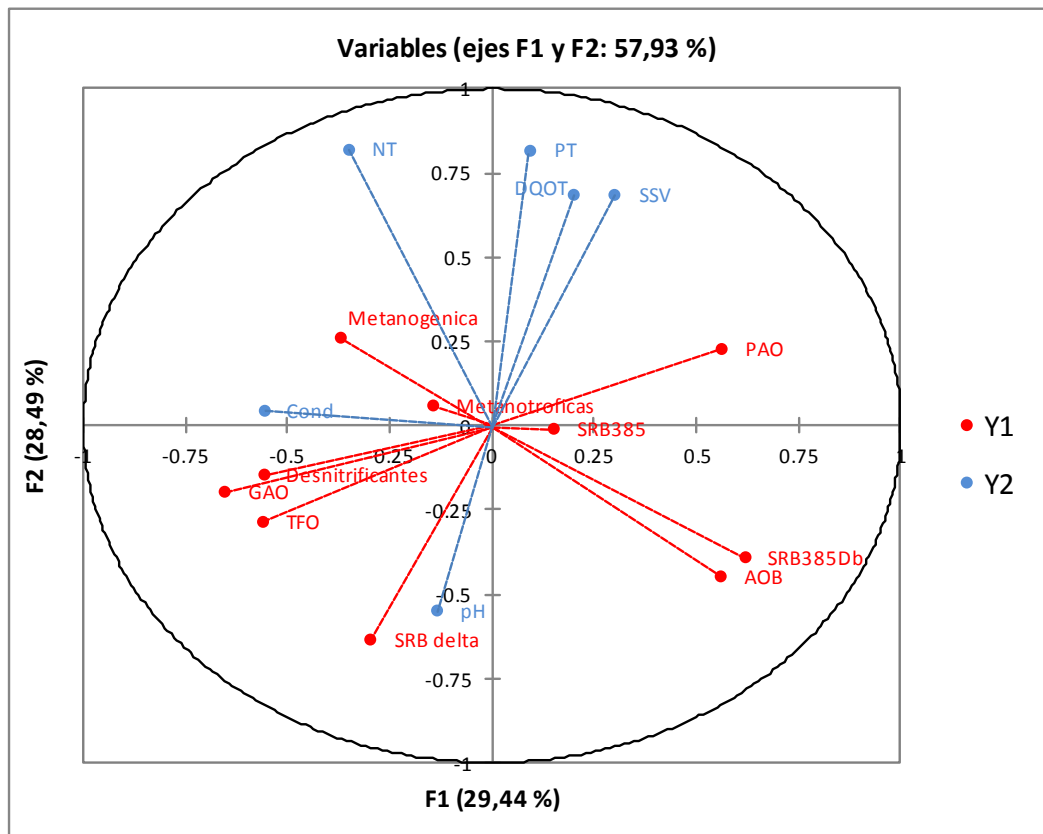


Figura 101. Gráfico de las correlaciones canónicas entre los grupos funcionales y las variables físico-químicas.

La interpretación del gráfico y tabla del CCorA es:

- El CCorA explica con los primero dos factores (F1 y F2) el 57,93% de la varianza.
- F1 (factor canónico 1 de la tabla 32) correlaciona positivamente con las poblaciones AOB, PAO y las bacterias pertenecientes a la sonda SRB385Db. Correlaciona negativamente con las poblaciones GAO, TFO, desnitrificantes y con la variable conductividad.
- F2 (factor canónico 2 de la tabla 32) correlaciona negativamente con la población SRB pertenecientes a δ -Proteobacteria y el pH, mientras tiene correlación positiva con las variables nitrógeno total, fósforo total, DQO total y SSV.
- F3 (factor canónico 3 de la tabla 32) correlaciona positivamente con GAO y negativamente con las SRB pertenecientes a δ -Proteobacteria y pH.

- F4 (factor canónico 3 de la tabla 32) correlaciona negativamente con la población de PAO y las variables fósforo total y DQO total.

Los resultados gráficos del AC se muestran en la figura 102. El AC explica el 57,69 % de la inercia.

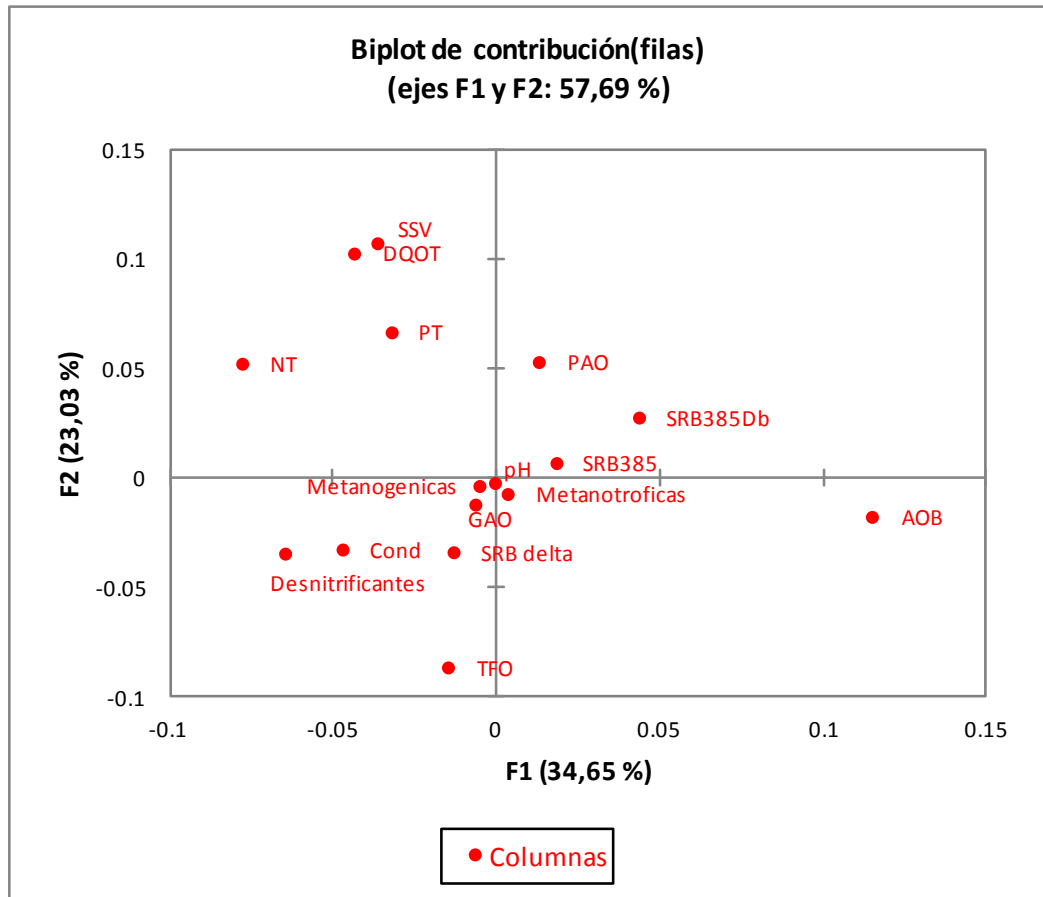


Figura 102. Análisis de correspondencia de los grupos funcionales y las variables físico-químicas.

La interdependencia posible encontrada con el AC para los grupos funcionales y las variables físico-químicas es:

- Las desnitrificantes con la conductividad
- Las metanogénicas, GAO, y metanotrofas con el pH

Según los AC realizados no parece haber una relación de interdependencia de los grupos funcionales con las variables físico-químicas.

En la tabla tabla 33 se detalla la parte de la inercia explicada con el AC (57,4%) y el restante que se explica con el ACC correspondiente. La inercia no restringida es de un alto porcentaje (42,5%). En la figura 103 se representan gráficamente los resultados del ACC.

Tabla 33. Partición de la inercia explicada

Inercia:		
	Valor	%
Total	0,130	100,000
Restringida	0,055	42,579
No-restringida	0,075	57,421

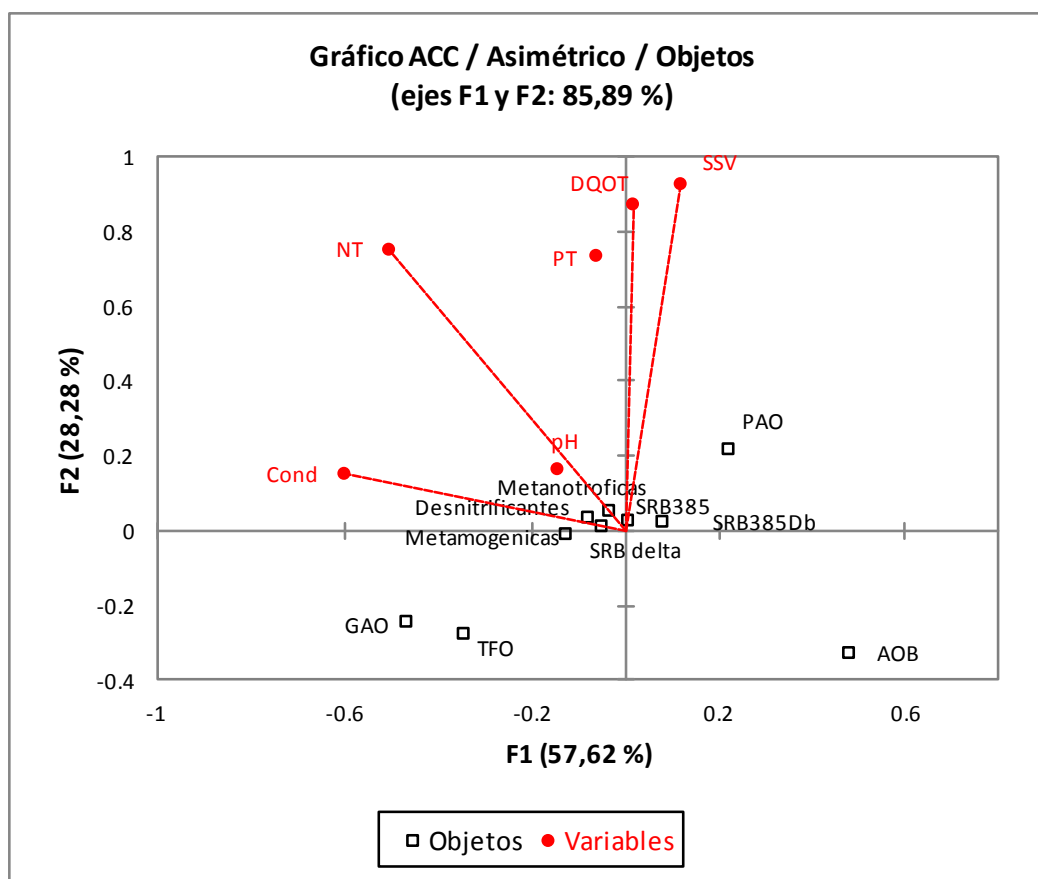


Figura 103. Análisis de correspondencia canónica de los grupos funcionales y las variables físico-químicas.

Los grupos funcionales tienen una relación directamente lineal con las variables físico-químicas según la prueba de permutación. Con excepción del pH todas las demás variables son significativas para las abundancias de las diferentes poblaciones de grupos funcionales.

Para analizar la representación gráfica del ACC debemos tener en cuenta el largo del vector de las variables, la posición del vector con respecto a los ejes y la posición de las comunidades con respecto a los vectores.

Las PAO y las bacterias halladas con la sonda SRB385 tienen relación directa con altos contenidos de DQO total y SSV. Las metanotrofas tienen relación directa con el nitrógeno total y posiblemente con el pH alto. Las desnitrificantes y las bacterias SRB de la clase *δ-Proteobacteria* tienen relación directa con la conductividad. Las GAO, TFO y las AOB no parecen tener relación directa con las variables físico-químicas analizadas.

Las poblaciones de phylum, clase y arqueas se relacionan directamente con las variables de operación mientras que las poblaciones de los grupos funcionales se relacionan directamente con las variables físico-químicas. Esto se ve reflejado también por la inercia total que se explica con los estadísticos: para las comunidades de phylum, clase de bacterias y arquea junto con las variables operacionales, la inercia total explicada con el AC es del 34,15 % mientras que usando el ACC un **40,45%**. Mientras que con las variables físico-químicas la inercia total explicada por el AC es del **52,69%** y con el ACC el 7.47%.

Para los grupos funcionales y las variables operacionales, la inercia total que se explica con el AC es **44,6%** y con el ACC es el 11,34%. Con respecto a las variables físico-químicas el AC explica una inercia total de 33,12% y el ACC un **36,56%**.

Para llevar a cabo los estadísticos de las abundancias de bacterias, arqueas y grupos funcionales, con las poblaciones de protozoos y metazoos, se dividieron por grupos las variables. Siempre resulta más fácil de interpretar y más fiables los estadísticos con menos variables. La división de los grupos se puede apreciar en la tabla 34.

Tabla 34. Grupos de los datos biológicos para estadísticos

Grupo Flagelados, Sarconidos y Carnívoros	
Flagelados	<i>Peranema trichophorum</i>
	<i>Entosiphon sp.</i>
Sarconidos	<i>Arcella sp</i>
	<i>Pyxidicula operculata</i>
	<i>Ameba pequeña</i>
Carnívoros	<i>Litonotus lamella</i>
	<i>Acineta tuberosa</i>
	<i>Periacineta sp.</i>
Grupo Bacterívoro	
Nadador	<i>Uronema nigricans</i>
Reptante	<i>Aspidisca cicada</i>
	<i>T. cuculullus</i>
	<i>Euplotes affinis</i>
	<i>P.fluviatis</i>
	<i>Trochilia minuta</i>
	<i>G. membranaceus</i>
Omnívoro	<i>Acinertia uncinata</i>
Grupo Bacterívoro Sésil	
	<i>Opercularia sp.</i>
	<i>E. plicatilis</i>
	<i>E. chrysemidis</i>
	<i>E. balatónica</i>
	<i>C.V convallaria</i>
	<i>C.V aquaducis</i>
	<i>Carchesium polypinum</i>
	<i>O.coarctata</i>
	<i>C.V infusium</i>
	<i>C.V microstoma</i>
Grupo Micrometazoos	
	<i>Rotaria</i>
	<i>Lecane sp</i>
	<i>Nematodo</i>

Una vez divididos los datos se llevaron a cabo los análisis correspondientes. Los resultados del CCorA de los 4 grupos formados para las comunidades de bacterias y arqueas se indican en las tablas 35, 36, 37 y 38.

Tabla 35. Correlaciones de los factores canónicos y las variables de las comunidades de bacterias y arqueas junto con los grupos de flagelados, sarcodinos y carnívoros

Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas:								
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
<i>α-Proteobacteria</i> (Alpha)	-0,425	-0,160	0,524	0,038	-0,093	-0,120	-0,004	0,254
<i>β-Proteobacteria</i> (Beta)	0,059	0,280	0,042	0,273	0,020	-0,576	-0,177	0,626
<i>Chloroflexi</i> (Chlor)	-0,693	0,018	0,377	-0,109	0,341	-0,188	0,238	-0,333
<i>γ-Proteobacteria</i> (Gamma)	0,014	-0,543	-0,458	-0,548	-0,336	-0,083	0,056	0,109
<i>Planctomycetes</i> (Planc)	-0,213	-0,406	0,518	0,185	0,253	0,516	0,389	0,023
<i>δ-Proteobacteria</i> (Delta)	0,569	-0,172	-0,039	-0,082	0,599	-0,264	0,154	-0,095
<i>Nitrospira</i> (Nitro)	-0,048	-0,364	0,246	0,352	0,222	0,470	-0,426	-0,378
<i>Archaea</i> (Arch)	0,415	0,314	0,253	-0,567	-0,019	0,000	-0,473	0,345
Otros	0,410	0,205	-0,200	0,085	-0,220	0,213	0,186	-0,747
Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas:								
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
<i>Peranema</i> (Prnm)	-0,527	0,443	0,106	-0,395	0,402	0,278	-0,045	0,343
<i>Entosiphon</i> (Etspn)	-0,483	0,272	0,197	0,057	0,793	-0,032	-0,047	0,140
<i>Arcella</i> (Acll)	-0,335	0,267	-0,037	0,254	0,269	-0,048	0,070	0,819
<i>Pyxidicula</i> (Pyxi)	-0,348	0,737	-0,124	0,364	-0,005	0,038	-0,430	0,037
<i>Ameba pequeña</i> (Ambpn)	0,081	0,043	-0,394	0,111	0,619	0,478	0,404	0,222
<i>Litonotus</i> (Ltnts)	-0,220	-0,480	-0,788	-0,026	0,217	-0,114	-0,092	0,175
<i>Acineta</i> (Acnt)	-0,696	0,285	-0,005	0,112	0,451	0,010	0,328	0,333
<i>Periacineta</i> (Prct)	-0,817	0,116	0,073	0,112	0,342	0,389	-0,067	0,166

En la tabla anterior están marcadas en negrita las correlaciones significativas. Con el CCorA se explica un 50,52% de la varianza.

Tabla 36. Correlaciones de los factores canónicos con las variables de las comunidades de bacterias y arqueas junto con la del grupo bacterívoros

Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas:								
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
<i>α-Proteobacteria</i> (Alpha)	-0,425	-0,160	0,524	0,038	-0,093	-0,120	-0,004	0,254
<i>β-Proteobacteria</i> (Beta)	0,059	0,280	0,042	0,273	0,020	-0,576	-0,177	0,626
<i>Chloroflexi</i> (Chlor)	-0,693	0,018	0,377	-0,109	0,341	-0,188	0,238	-0,333
<i>γ-Proteobacteria</i> (Gamma)	0,014	-0,543	-0,458	-0,548	-0,336	-0,083	0,056	0,109
<i>Planctomycetes</i> (Planc)	-0,213	-0,406	0,518	0,185	0,253	0,516	0,389	0,023
<i>δ-Proteobacteria</i> (Delta)	0,569	-0,172	-0,039	-0,082	0,599	-0,264	0,154	-0,095
<i>Nitrospira</i> (Nitro)	-0,048	-0,364	0,246	0,352	0,222	0,470	-0,426	-0,378
<i>Archaea</i> (Arch)	0,415	0,314	0,253	-0,567	-0,019	0,000	-0,473	0,345
Otros	0,410	0,205	-0,200	0,085	-0,220	0,213	0,186	-0,747
Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas:								
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
<i>Uronema</i> (Urnem)	-0,527	0,443	0,106	-0,395	0,402	0,278	-0,045	0,343
<i>Asidisca</i> (Apdsc)	-0,483	0,272	0,197	0,057	0,793	-0,032	-0,047	0,140
<i>T. cuculullus</i> (Tcucu)	-0,335	0,267	-0,037	0,254	0,269	-0,048	0,070	0,819
<i>Euplotes</i> (Eplts)	-0,348	0,737	-0,124	0,364	-0,005	0,038	-0,430	0,037
<i>P. fluviatis</i> (Pflvt)	0,081	0,043	-0,394	0,111	0,619	0,478	0,404	0,222
<i>Trochilia</i> (Trchl)	-0,220	-0,480	-0,788	-0,026	0,217	-0,114	-0,092	0,175
<i>G. membranaceus</i> (Gmmbr)	-0,696	0,285	-0,005	0,112	0,451	0,010	0,328	0,333
<i>Acinertia</i> (Acnr)	-0,817	0,116	0,073	0,112	0,342	0,389	-0,067	0,166

En la tabla 36 están marcadas en negrita las correlaciones significativas. La varianza explicada con el CCorA ha sido del 50,52%.

Tabla 37. Correlaciones entre los factores canónicos y las variables de las comunidades de bacterias y arqueas junto con el grupo de bacterívoros sésiles

Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas:									
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
<i>α-Proteobacteria</i> (Alpha)	0,244	-0,537	0,493	-0,236	-0,140	0,293	0,001	0,423	0,263
<i>β-Proteobacteria</i> (Beta)	-0,143	0,161	0,189	0,137	0,154	0,283	0,514	0,375	-0,625
<i>Chloroflexi</i> (Chlor)	-0,417	-0,579	-0,138	-0,441	0,065	0,369	0,160	-0,307	0,133
<i>γ-Proteobacteria</i> (Gamma)	0,390	-0,141	-0,546	0,182	-0,552	-0,306	0,155	-0,131	-0,239
<i>Planctomycetes</i> (Planc)	0,320	-0,375	0,121	-0,416	0,255	0,297	-0,507	-0,391	-0,074
<i>δ-Proteobacteria</i> (Delta)	0,309	0,520	-0,368	-0,132	0,113	0,457	-0,021	0,264	0,435
<i>Nitrospira</i> (Nitro)	0,207	-0,228	0,036	-0,304	0,590	-0,347	-0,408	0,141	0,396
<i>Archaea</i> (Arch)	-0,133	0,488	0,095	-0,410	-0,431	-0,210	-0,057	0,522	-0,247
Otros	-0,151	0,465	-0,049	0,123	0,116	-0,388	0,004	-0,672	0,357
Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas:									
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
<i>O.articulata</i> (Oarti)	-0,582	-0,294	0,005	-0,184	-0,293	0,293	-0,473	0,285	-0,206
<i>E.plicatilis</i> (Epli)	-0,459	-0,306	-0,068	-0,237	0,268	0,572	-0,266	0,385	0,051
<i>E. chysemidis</i> (Echry)	-0,301	-0,205	0,118	0,174	0,190	0,363	-0,099	0,245	-0,558
<i>E. balatónica</i> (Ebala)	-0,675	-0,070	0,398	0,349	0,219	-0,001	-0,025	0,356	-0,147
<i>C.V aquaducis</i> (Cvaq)	-0,062	0,138	-0,326	0,270	0,230	0,331	-0,714	-0,101	0,011
<i>C.V. convallaria</i> (Cvencv)	0,194	-0,313	-0,699	0,515	0,063	-0,086	-0,019	0,249	-0,023
<i>Carchesium</i> (Crchs)	-0,476	-0,508	0,020	0,096	0,096	0,560	-0,224	0,036	-0,094
<i>O. coarctata</i> (Ocoar)	-0,407	-0,700	0,029	-0,023	0,159	0,240	-0,461	0,107	-0,188
<i>C.V infusium</i> (CvInf)	-0,420	-0,281	-0,540	-0,089	0,038	0,465	0,069	-0,143	-0,296
<i>C.V microstoma</i> (Cvmic)	-0,370	-0,067	0,073	-0,547	0,217	-0,510	0,388	-0,307	0,024

En la tabla 37 están marcadas las correlaciones significativas en negrita para poder distinguirlas. Se explica un 45,38% de la varianza con el CCorA.

Tabla 38. Correlaciones entre los factores canónicos y las variables de las comunidades de bacterias y arqueas junto con el grupo micrometazoos

Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas:			
	F1	F2	F3
<i>α-Proteobacteria</i> (Alpha)	-0,216	-0,165	-0,003
<i>β-Proteobacteria</i> (Beta)	0,044	-0,325	-0,469
<i>Chloroflexi</i> (Chlor)	-0,643	-0,342	0,266
<i>γ-Proteobacteria</i> (Gamma)	0,293	0,547	0,118
<i>Planctomycetes</i> (Planc)	-0,113	-0,302	0,286
<i>δ-Proteobacteria</i> (Delta)	0,243	-0,319	0,505
<i>Nitrospira</i> (Nitro)	0,077	-0,333	0,400
<i>Archaea</i> (Arch)	-0,145	0,480	0,235
Otros	0,312	0,260	0,117
Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas:			
	F1	F2	F3
Rotaria	-0,973	0,074	-0,216
Lecane	-0,798	-0,603	-0,003
Nematodo	-0,424	-0,377	-0,824

El CCorA explica un 89,82% de la variabilidad. Podemos ver en la tabla 38 las correlaciones significativas en negra.

Como podemos ver en las tablas 35, 36, 37 y 38 correspondientes al CCorA, existen correlaciones entre las comunidades de bacterias y arqueas con los grupos de protozoos y metazoos.

Se realizó igualmente el AC de las comunidades de bacteria y arquea con cada grupo de protozoos, sin embargo no se encontraron interdependencias en ninguno de los análisis realizados.

Considerando que el CCorA maximiza las correlaciones existentes, se realizaron los correspondientes ACC a cada grupo de protozoos para determinar si existe alguna relación directa con alguna comunidad de bacterias y arqueas. En las figuras 104, 105

y 106 podemos ver los resultados de los ACC. Cabe señalar que para los micrometazoos no se pudo realizar este análisis por un error al procesar los datos con el XLSTAT. Para los demás grupos el ACC resultó lineal según la prueba de permutación, por lo que las comunidades de bacterias y arqueas tienen relación directa con los grupos de protozoos y metazoos.

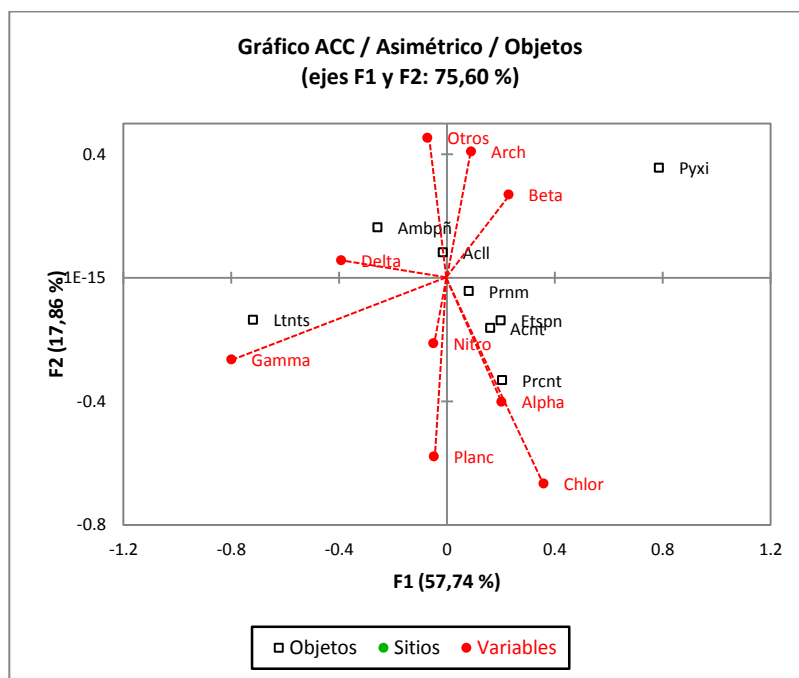


Figura 104. Análisis de correspondencia canónica entre las comunidades de bacterias, arqueas y los protozoos flagelados, sarcodinos y carnívoros.

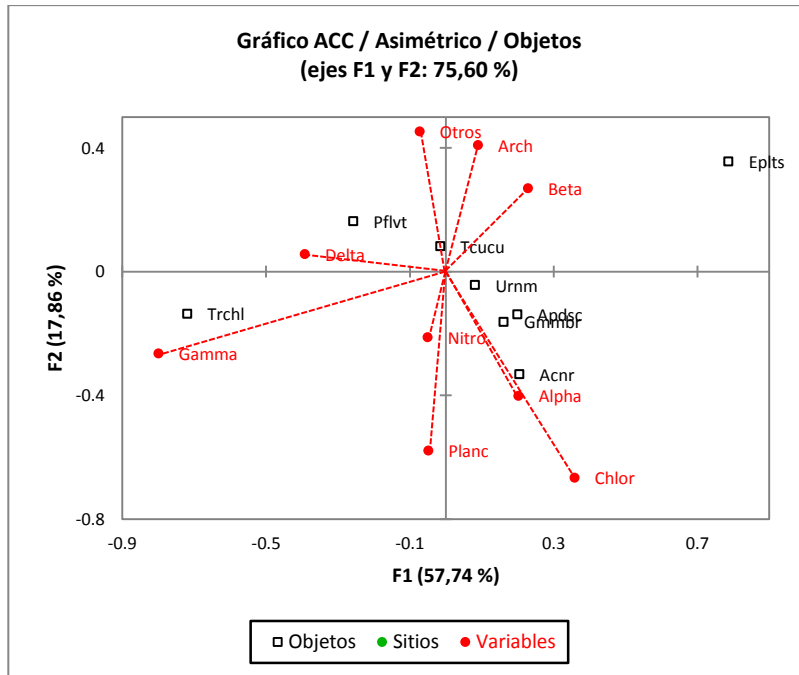


Figura 105. Análisis de correspondencia canónica entre las comunidades de bacterias, arqueas y el los protozoos bacterívoros.

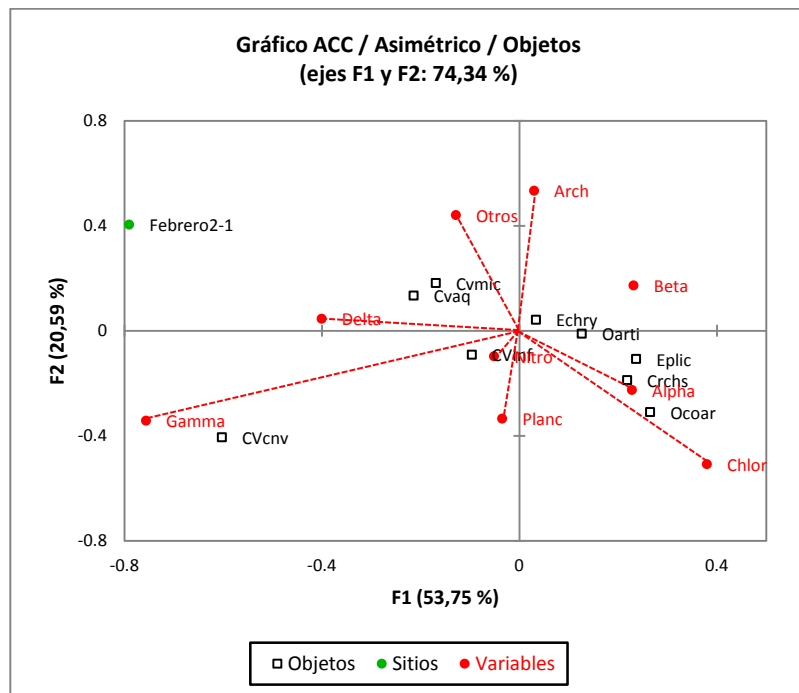


Figura 106. Análisis de correspondencia canónica entre las comunidades de bacterias, arqueas los protozoos sésiles.

La inercia restringida entre las comunidades de bacterias, arqueas y los protozoos flagelados, sarcodinos y carnívoros fue de 34,65% (dato obtenido en la

descomposición de la inercia durante el proceso de ACC), y se explica un 75,60% (figura 104) de ella en el ACC. En la figura 104 se observa que las poblaciones de *Chloroflexi* seguidas de γ -*Proteobacteria* y de *Planctomycetes* son las más significativas para el grupo de protozoos flagelados, sarcodinos y carnívoros. Las relaciones lineales que se pueden observar son:

- *Pyxidicula operculata* tiene relacionada su abundancia a elevadas abundancias de arqueas y β -*Proteobacteria*.
- Las abundancias de *Peranema trichophorum*, *Entosiphon sp.*, *Acineta tuberosa* y *Periacineta sp.* están relacionadas con altas abundancias de α -*Proteobacteria* y *Chloroflexi*.
- *Litonotus lamella* está relacionado con altas abundancias de γ -*Proteobacteria*.

El ACC correspondiente para el grupo de protozoos bacterívoros (nadadores, reptantes y omnívoros) tiene una inercia restringida del 34,65% (dato obtenido en la descomposición de la inercia durante el proceso de ACC) de la cual se explica con el ACC un 75,60% (figura 105) de ella. En la figura 105 se observa que las comunidades con más significancia para explicar la relación entre este grupo son γ -*Proteobacteria*, seguida de *Chloroflexi* y *Planctomycetes*. Las relaciones lineales correspondientes son:

- *Euplotes affinis*, está linealmente relacionado con abundancias altas de arqueas y β -*Proteobacteria*.
- *Uronema nigricans*, *Aspidisca cicada*, *G. membranaceus* y *Acineria uncinata* están relacionadas con altas abundancias de α -*Proteobacteria* y *Chloroflexi*.
- *P.fluviatis* está relacionado con abundancias altas de δ -*Proteobacteria*.
- *Trochilia minuta* está relacionado con abundancias altas de γ -*Proteobacteria*.

El ACC para el grupo de los protozoos sésiles cuenta con una inercia restringida de 33,43% (dato obtenido en la descomposición de la inercia durante el proceso de ACC) de la cual se explica un 74,34% (figura 106). En la figura 106 se puede observar que las poblaciones γ -*Proteobacteria*, *Chloroflexi* y δ -*Proteobacteria* tienen más significancia para explicar la relación lineal existente. Las relaciones lineales que se observan son:

- Las abundancias de *E. chrysemidis* están linealmente relacionadas con altas abundancias de arqueas y β -*Proteobacteria*.

- Las abundancias de *E. plicatilis*, *Carchesium polypinum* y *O.coarctata* están linealmente relacionadas con abundancias elevadas de α -*Proteobacteria*.
- La abundancia de *C.V infusium* tiene relación lineal con altas abundancias de *Nitrospira*.
- La abundancia de *C.V aquaducis* y de *C.V microstoma* están linealmente relacionada con elevada abundancia de δ -*Proteobacteria*.
- La abundancia de *C.V convallaria* están relacionada con la abundancia alta de γ -*Proteobacteria*.

Al igual que con las comunidades de bacterias y arqueas se realizaron los tres análisis estadísticos para los protozoos y metazoos con los grupos funcionales. Los AC correspondientes no fueron significativos pues no se encontró interdependencia entre las variables. Por lo tanto solo se detallan los resultados obtenidos de CCorA y de ACC.

En las tablas 39, 40, 41 y 42 se puede ver los resultados de las correlaciones canónicas para cada uno de los grupos de protozoos y metazoos.

Tabla 39. Correlaciones entre los factores canónicos y los grupos funcionales de bacterias y arqueas y los protozoos flagelados, sarcodinos y carnívoros

Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas:								
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
AOB	0,483	-0,086	0,294	0,644	-0,001	-0,416	-0,134	0,044
PAO	0,495	0,664	-0,383	0,115	0,085	0,036	-0,086	-0,302
GAO	-0,667	0,041	0,004	0,092	0,546	-0,205	-0,065	0,045
TFO	-0,451	-0,418	-0,081	0,160	-0,088	-0,357	0,202	-0,447
Metanotrofas	-0,141	-0,050	-0,645	0,133	0,152	-0,104	0,473	0,239
Desnitrificantes	-0,301	0,148	0,070	-0,567	0,010	-0,295	0,094	0,031
SRB delta	0,036	-0,405	-0,079	-0,553	0,540	-0,382	0,226	0,001
SRB385	0,157	-0,112	-0,275	0,166	-0,358	0,008	-0,656	0,383
SRB385Db	0,801	-0,417	0,220	-0,050	0,080	0,346	-0,058	0,018
Metanogénicas	-0,435	0,008	0,052	0,315	0,032	0,067	-0,631	-0,292
Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas:								
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
<i>Peranema</i> (Prnm)	0,852	-0,322	-0,005	-0,038	-0,045	0,088	0,224	-0,330
<i>Entosiphon</i> (Etspn)	0,847	0,012	0,175	-0,155	-0,304	-0,362	0,042	-0,057
<i>Arcella</i> (Accl)	0,772	-0,054	0,164	0,237	0,140	0,050	0,258	0,480
<i>Pyxidicula</i> (Pyxi)	0,549	0,540	0,098	0,525	-0,093	0,186	0,037	-0,278
<i>Ameba pequeña</i> (Ambpñ)	0,339	-0,490	0,120	0,042	-0,646	0,207	-0,156	0,381
<i>Litonotus</i> (Ltnts)	-0,211	-0,376	0,730	0,252	-0,236	-0,114	0,346	0,171
<i>Acineta</i> (Acnt)	0,858	-0,062	0,437	-0,202	-0,049	0,097	0,028	0,126
<i>Periacineta</i> (Prent)	0,704	0,100	0,284	-0,266	-0,302	0,206	0,435	-0,139

Están marcadas en negrita las variables que se correlacionan significativamente en la tabla 39. Existe correlación entre ambos grupos de variables (por un lado bacterias y arquea y por otro los protozoos) con los factores 1, 2, 3, 4 y 5. Se explica el 48,04% de la varianza con los factores 1 y 2 del CCorA.

Tabla 40. Correlaciones entre los factores canónicos y los grupos funcionales de bacterias, arqueas y los protozoos bacterívoros nadadores, reptantes y omnívoros

Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas:								
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
AOB	0,483	-0,086	0,294	0,644	-0,001	-0,416	-0,134	0,044
PAO	0,495	0,664	-0,383	0,115	0,085	0,036	-0,086	-0,302
GAO	-0,667	0,041	0,004	0,092	0,546	-0,205	-0,065	0,045
TFO	-0,451	-0,418	-0,081	0,160	-0,088	-0,357	0,202	-0,447
Metanotrofas	-0,141	-0,050	-0,645	0,133	0,152	-0,104	0,473	0,239
Desnitrificantes	-0,301	0,148	0,070	-0,567	0,010	-0,295	0,094	0,031
SRB delta	0,036	-0,405	-0,079	-0,553	0,540	-0,382	0,226	0,001
SRB385	0,157	-0,112	-0,275	0,166	-0,358	0,008	-0,656	0,383
SRB385Db	0,801	-0,417	0,220	-0,050	0,080	0,346	-0,058	0,018
Metanogénicas	-0,435	0,008	0,052	0,315	0,032	0,067	-0,631	-0,292
Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas:								
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
<i>Uronema</i> (Urnrm)	0,852	-0,322	-0,005	-0,038	-0,045	0,088	0,224	-0,330
<i>Asidisca</i> (Apdsc)	0,847	0,012	0,175	-0,155	-0,304	-0,362	0,042	-0,057
<i>T. cuculullus</i> (Tcucu)	0,772	-0,054	0,164	0,237	0,140	0,050	0,258	0,480
<i>Euplotes</i> (Eplts)	0,549	0,540	0,098	0,525	-0,093	0,186	0,037	-0,278
<i>P. fluviatis</i> (Pflvt)	0,339	-0,490	0,120	0,042	-0,646	0,207	-0,156	0,381
<i>Trochilia</i> (Trchl)	-0,211	-0,376	0,730	0,252	-0,236	-0,114	0,346	0,171
<i>G. membranaceus</i> (Gmmbr)	0,858	-0,062	0,437	-0,202	-0,049	0,097	0,028	0,126
<i>Acineria</i> (Acnr)	0,704	0,100	0,284	-0,266	-0,302	0,206	0,435	-0,139

En la tabla 40, los 5 primeros factores son los que se correlacionan con las variables de ambos grupos (por un lado bacterias y arquea y por otro los protozoos). El CCorA de los grupos funcionales con los protozoos bacterívoros explica un 48,04% de la varianza.

Tabla 41. Correlación entre los factores canónicos y los grupos funcionales de bacterias, arqueas y los protozoos sésiles

Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas:										
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
AOB	-0,519	0,435	0,107	0,642	0,017	0,279	-0,067	0,056	0,139	-0,109
PAO	-0,457	-0,472	-0,650	0,151	0,009	0,093	0,244	0,158	0,081	0,149
GAO	0,676	-0,024	-0,050	0,005	-0,296	0,521	0,114	0,186	-0,365	0,008
TFO	0,452	-0,019	0,401	0,072	0,072	0,091	0,174	0,757	-0,053	-0,099
Metanotrofas	0,164	-0,689	0,168	0,195	-0,073	0,055	-0,308	0,224	-0,384	0,364
Desnitrificantes	0,314	0,035	-0,212	-0,539	0,164	0,129	-0,129	0,349	-0,373	0,494
SRB delta	-0,035	-0,119	0,384	-0,574	-0,122	0,529	-0,417	0,109	0,097	-0,134
SRB385	-0,167	-0,025	0,108	0,240	0,562	0,044	0,451	-0,325	-0,473	-0,228
SRB385Db	-0,807	0,131	0,356	-0,197	-0,260	-0,156	0,217	-0,151	-0,038	0,048
Metanogénicas	0,425	0,199	-0,027	0,281	0,102	0,215	0,501	-0,261	0,413	0,392
Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas:										
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
<i>O.articulata</i> (Oarti)	-0,853	-0,042	0,290	-0,107	-0,047	-0,118	0,050	0,132	0,301	-0,218
<i>E.plicatilis</i> (Epli)	-0,853	0,172	-0,060	-0,121	0,251	-0,075	-0,165	0,338	0,029	0,117
<i>E. chysemidis</i> (Echry)	-0,776	0,084	0,041	0,155	-0,276	-0,001	-0,038	0,037	-0,498	-0,197
<i>E. balatónica</i> (Ebala)	-0,544	0,016	-0,512	0,520	-0,189	-0,202	0,139	0,016	0,269	-0,057
<i>C.V aquaducis</i> (Cvaq)	-0,355	0,199	0,456	0,013	0,296	-0,558	0,215	-0,030	-0,385	0,176
<i>C.V. convallaria</i> (Cvcnv)	0,178	0,710	0,323	0,122	-0,215	-0,287	-0,103	0,370	-0,223	-0,139
<i>Carchesium</i> (Crchs)	-0,865	0,324	-0,020	-0,281	-0,144	-0,169	-0,016	0,001	-0,129	0,020
<i>O. coarctata</i> (Ocoar)	-0,704	0,167	-0,153	-0,275	-0,015	-0,466	-0,137	0,125	0,114	-0,335
<i>C.V infusium</i> (CvInf)	-0,390	0,182	0,158	-0,073	-0,181	-0,304	-0,743	-0,040	0,239	0,219
<i>C.V microstoma</i> (Cvmic)	0,179	-0,615	-0,378	-0,292	-0,405	-0,003	-0,129	0,307	0,158	0,247

En la tabla 41, los factores 1, 2, 3, 4, 6 y 7 son los que se correlacionan con variables de ambos grupos (por un lado bacterias y arquea y por otro los protozoos). El CCorA correspondiente para los grupos funcionales y los protozoos sésiles explica el 42,76% de la varianza.

Tabla 42. Correlación de los factores canónicos y los grupos funcionales de bacterias, arqueas y los micrometazoos

Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas:			
	F1	F2	F3
AOB	-0,528	0,081	0,474
PAO	-0,347	0,189	0,247
GAO	0,683	-0,138	0,263
TFO	0,364	-0,129	-0,293
Metanotrofas	0,174	-0,329	-0,049
Desnitrificantes	0,295	0,414	-0,264
SRB delta	-0,079	-0,155	-0,363
SRB385	-0,123	0,055	-0,154
SRB385Db	-0,843	-0,359	-0,073
Metanogénicas	0,462	-0,057	0,109
Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas:			
	F1	F2	F3
Rotaria	-0,903	-0,263	-0,340
Lecane	-0,888	0,439	-0,138
Nematodo	-0,801	-0,143	0,581

Existen correlaciones entre los micrometazoos con los grupos funcionales, como se puede ver por las variables marcadas en negrita en la tabla 42. El CCorA explica un 90,34% de la variabilidad.

Como podemos ver en las tablas correspondientes al CCorA (39, 40, 41 y 42), existen correlaciones entre los grupos funcionales de bacterias, arqueas y los grupos de protozoos y metazoos.

Para saber si algún grupo funcional tiene relación directa con la presencia de los protozoos y metazoos se llevó a cabo los correspondientes ACC para cada grupo. En las figuras 107, 108 y 109 se puede ver los resultados de los ACC. Cabe señalar que para los micrometazoos no se pudo realizar este análisis, por un error en el proceso del análisis con el programa XLSTAT. Para los demás grupos el ACC demostró que había linealidad entre los grupos de organismos según prueba de permutación.

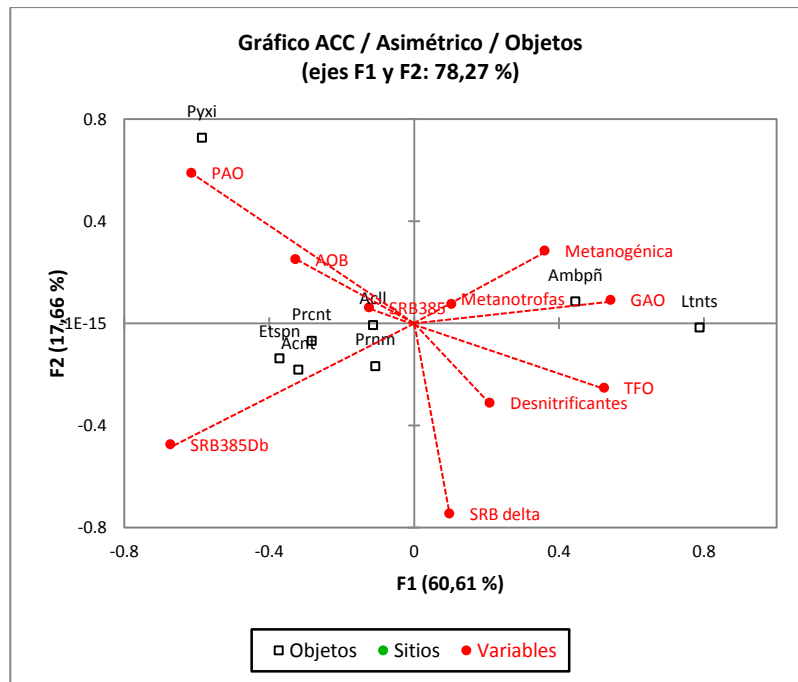


Figura 107. Análisis de correspondencia canónica entre los grupos funcionales de bacterias, arqueas y protozoos flagelados, sarcodinos y carnívoros.

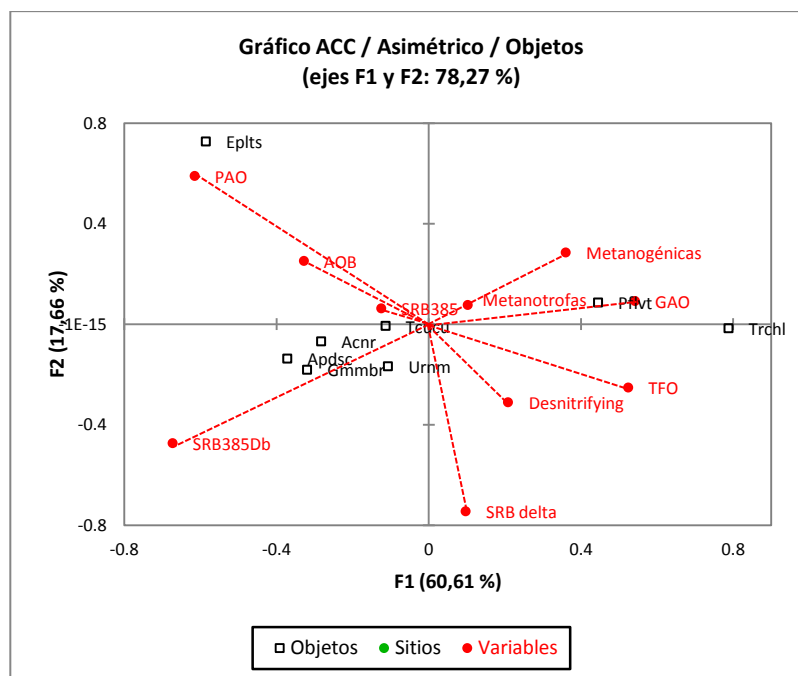


Figura 108. Análisis de correspondencia canónica entre los grupos funcionales de bacterias, arqueas y protozoos bacterívoros.

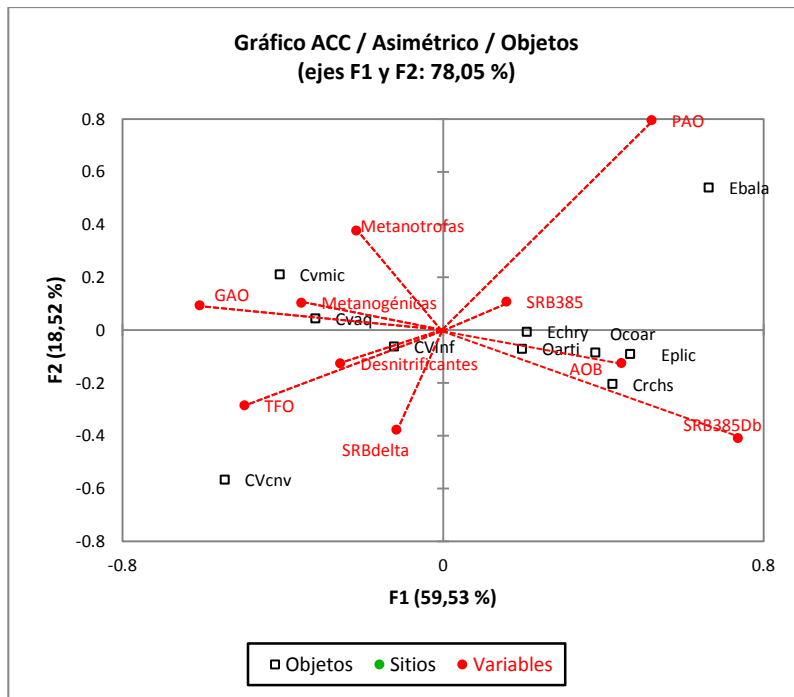


Figura 109. Análisis de correspondencia canónica entre los grupos funcionales de bacterias, arqueas y protozoos sésiles.

La inercia restringida en el análisis de los protozoos flagelados, sarcodinos y carnívoros es de 49,55% (dato obtenido en la partición de la inercia total en el análisis ACC) de las cuales se explica un 78,27% (figura 107) con el ACC. Se comprobó que los grupos funcionales con estos grupos de protozoos tienen relación directa. Los grupos funcionales más significativos para estos protozoos son los hallados con la sonda SRB385Db, seguidos de las PAO y luego de forma por igual las bacterias halladas por la sonda que detecta a la SRB perteneciente a la δ -Proteobacteria, TFO y GAO. Las relaciones que se deducen con este análisis son:

- Las *amebas pequeñas* están relacionadas directamente con las altas abundancias de metanogénicas, GAO y metanotrofas.
- El protozoo *Pyxidicula operculata* está relacionada directamente con las elevadas abundancias de PAO.
- Los protozoos *Entosiphon sp.*, *Acineta tuberosa*, *Periacineta sp.* y *Peranema trichophorum* están relacionados con las abundancias elevadas de las bacterias detectadas con la sonda SRB385Db.

La inercia restringida del análisis de los protozoos bacterívoros es de 49,55% (dato obtenido en la partición de la inercia total en el análisis ACC) explicando un

78,27% (figura 108) de ella por el ACC. Según la prueba de permutación estos protozoos están linealmente relacionados con los grupos funcionales. Los grupos funcionales más significativos para el grupo de protozoos bacterívoros son los hallados con la sonda SRB385Db, seguidos de las PAO y luego de forma por igual las bacterias halladas por la sonda SRBdelta, TFO y GAO. Las relaciones directas que podemos establecer en este análisis son:

- Las abundancias de *P.fluviatis* se relacionan con elevadas abundancias de metanogénicas, GAO y metanotrofas.
- Las abundancias de *Euplotes affinis* se relaciona con elevadas abundancias de PAO.
- Las abundancias de los protozoos *Acineria uncinata*, *Aspidisca cicada* y *G. membranaceus* se relacionan con altas abundancias de las bacterias halladas con la sonda SRB385Db.

Para el grupo de los protozoos sésiles se cuenta con una inercia restringida del 51,77% (dato obtenido en la partición de la inercia total en el análisis ACC) y se explica un 78,05% (figura 109) de ella con el ACC. Según prueba de permutación este grupo de protozoos está directamente relacionado con las presencia de los grupos funcionales. Los grupos funcionales que más significancia tienen para estos protozoos son las bacterias halladas con la sonda SRB385Db, seguida de las PAO y después GAO. Los resultados obtenidos son:

- El protozoo *E. balatónica* tiene relación directa con abundancias elevadas de PAO.
- Los protozoos *E. chrysemidis*, *Opercularia sp.*, *O.coarctata*, *E. plicatilis* y *Carchesium polypinum* tienen relación directa con elevadas concentraciones de AOB y las bacterias halladas con la sonda SRB385Db.
- Los protozoos *C.V microstoma* y *C.V aquaducis* tienen relación directa con altas abundancias de GAO y metanogénicas.
- Los protozoos *C.V convallaria* y *C.V infusium* tienen relación directa con elevadas concentraciones de desnitrificantes, TFO y bacterias SRB delta.

El ACC entre comunidades de bacterias, arqueas y protozoos flagelados, sarcodinos y carnívoros explica un 26,19% de la inercia total. Los resultados de este análisis coinciden con el CCorA en que las *Chloroflexi* tienen relación lineal con los protozoos *Peranema trichophorum*, *Acineta tuberosa* y *Periacineta*.

A diferencia de lo que pasa con las comunidades de bacterias y arquea, con los grupos funcionales se explica más la inercia total con el ACC, esto lo podemos ver en los siguientes párrafos:

- La inercia que se explica con el ACC de las comunidades de bacterias y arqueas junto a los protozoos flagelados, sarcódino y carnívoros es del 26,19% del total. Los análisis ACC y CCorA coinciden en que los protozoos *Peranema*, *Acineta* y *Periacineta* se relacionan con la comunidad de *Chloroflexi*.
- La inercia total explicada con el ACC de los grupos funcionales de bacterias y arqueas junto con los protozoos flagelados, sarcódinos y carnívoros es del **38,78%**. El ACC y CCorA coinciden en que las *amebas pequeñas* tienen relación con las GAO pero con el ACC se relaciona positivamente y con el CCorA se relaciona negativamente. Los protozoos *Entosiphon sp.*, *Acineta tuberosa*, *Periacineta sp.* y *Peranema trichophorum* tienen relación con las bacterias halladas con la sonda SRB385Db. *Pyxidicula operculata* tiene relación con las bacterias PAO.
- El ACC correspondiente entre comunidades de bacterias y arqueas junto con los protozoos bacterívoros (nadadores, reptantes y omnívoros) explica un 26,19% de la inercia total. Este análisis coincide con el CCorA en que las *Chloroflexi* tienen relación con los protozoos *Uronema nigricans*, *G. membranaceus* y *Acineria uncinata*.
- El ACC de los grupos funcionales de bacterias y arqueas junto con los protozoos bacterívoros (nadadores, reptantes y omnívoros) explica un **38,78%** de la inercia total. Al comparar los estadísticos ACC y CCorA se observan coincidencias de resultados como: *Euplotes affinis* que se relaciona con las bacterias PAO, *P.fluviatis* se relaciona con las bacterias GAO, *Acineria uncinata*, *Aspidisca cicada* y *G. membranaceus* que se relacionan con las bacterias halladas con la sonda SRB385Db.
- Un 24,85% de la inercia total se explica con el ACC de las comunidades de bacterias y arqueas junto con los protozoos bacterívoros sésiles. El ACC coincide con el CCorA en: *Carchesium polypinum* y *O.coarctata* se relacionan con α -*Proteobacteria*. La población de *E. chrysemidis* se relaciona con β -*Proteobacteria*. También coincide en que *C.V convallaria* se relaciona con γ -*Proteobacteria*.
- La inercia total que se explica en el ACC correspondiente a los grupos funcionales de bacterias y arqueas junto con los protozoos sésiles es del **40,40%**. Los resultados de ambos estadísticos coinciden en: los protozoos

E. chrysemidis, *Opercularia sp.*, *O.coarctata*, *E. plicatilis* y *Carchesium polypinum* que se relacionan con las AOB y con las bacterias halladas con la sonda SRB385Db. Los protozoos *C.V microstoma* se relacionan las arqueas metanogénicas. *E. balatónica* se relaciona con las bacterias PAO y *C.V aquaducis* se relaciona con las bacterias GAO pero con el ACC se relaciona positivamente y con el CCorA se relaciona negativamente.

La interpretación de las relaciones de los protozoos con las bacterias y arqueas presentes en las muestras así como los grupos funcionales es que comparten características ambientales para su proliferación y abundancia.

Discusión

5 Discusión

La mayoría de los estudios existentes sobre las poblaciones bacterianas se centran en la identificación de la comunidad de bacterias a nivel de phylum (filo) y clases, o de los grupos funcionales por separado. En el caso de los grupos funcionales suelen identificarse uno, dos o tres grupos de interés en sistemas de depuración biológica como los bioreactores de membrana (MBR), Yu *et al.*, (2011) han estudiado las bacterias nitrificantes en un proceso MBR, o la eliminación biológica del fósforo (EBPR). Kong *et al.*, (2004) se centraron en el estudio de *Rhodocyclus* en un proceso EBPR.

Hay poca información de estudios donde se identifique la población de diversos phylum bacterianos y grupos funcionales al mismo tiempo, y aún son más escasos los estudios que analizan las relaciones entre los parámetros operacionales, físico químicos, comunidades de protozoos, comunidades de bacterias, arqueas y grupos funcionales en fangos activos. La mayoría de los estudios encontrados se centran en las posibles relaciones entre las variables operacionales y físico-químicas con las bacterias filamentosas y las comunidades de protozoos (Signorile *et al.*, 2010; Çiğgin *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2012).

Mediante el uso de técnicas como PCR, DGGE, T-RFLP, SSCP y Pyrosecuenciación, se puede llegar a determinar la abundancia de las distintas comunidades de bacterias y arquea presentes en las muestras de fangos activos. Sin embargo estas técnicas cuantifican únicamente el DNA presente. Con la técnica FISH se conoce no solo la abundancia aproximada de las poblaciones, sino también la morfología y distribución de las bacterias presentes.

Juretschko *et al.*, (2002) identificaron con la técnica FISH un 89% de las bacterias presentes en los de fangos activos de una planta industrial. Este porcentaje se refiere a bacterias Gram negativas, quedando excluidas las bacterias *Firmicutes* y *Actinobacterias* (Gram positivas). Cuando el objetivo es aplicar la técnica FISH para conocer las abundancias de diversos grupos de bacterias tanto Gram positiva como Gram negativa dentro de la población general, se presenta el problema en la fijación y permeabilización. Roller *et al.*, (1994) demostraron que cuando las células Gram positivas se fijaban con PFA, la sonda HGC69a específica del phylum *Actinobacteria* no hibridaba sobre toda la población de *Actinobacteria*. Para favorecer la permeabilización de las *Actinobacterias* realizaron un pretratamiento con lisozima antes de la hibridación, concluyendo que la lisozima ayudaba a la penetración de distintas células detectadas con HGC69a, pero el uso de la enzima dificultaba la interpretación del resultado de las células en muestras de fangos activos, estableciendo que la fijación con etanol en frío era la más adecuada para la hibridación de las células

Actinobacteria. Meier *et al.*, (1999) demostraron, que se obtenían mejores resultados con fijación mediante etanol y lisozima para la detección de las *Firmicutes* con las sondas LGC354mix. Thurnheer *et al.*, (2004) realizaron un estudio para poder incluir a las bacterias Gram positiva en sus cuantificaciones con la técnica FISH, estos autores proponen una fijación con PFA (1 hora) y 9 min de tratamiento con lisozima.

En las pruebas realizadas en este trabajo con distintos tiempos de fijación y tratamiento con lisozima, e incubaciones con esta enzima a diferentes tiempos y temperaturas, no se ha podido obtener un protocolo que resuelva la fijación y permeabilización simultánea de las poblaciones de bacterias Gram negativas y Gram positivas. Thurnheer *et al.*, (2004) tampoco han podido resolver este problema de la detección de ambos tipos de células ya que depende del tipo de muestra. No se ha podido conocer el porcentaje de las Gram positiva con respecto a la población general (Gram positiva + Gram negativa) con la técnica FISH, porque la permeabilización con lisozima daña la pared celular de las Gram negativas y elimina parte de esta población. Esto impide la cuantificación simultánea de las bacterias Gram negativas con las bacterias Gram positivas.

En el análisis estadístico de las variables se utilizó el CCorA que maximiza las correlaciones lineales, por lo que aunque exista una correlación significativa entre dos variables, no se debe confundir correlación con causalidad. La relación de causa debe ser determinada mediante el conocimiento del área de estudio (Siegal, 1983). La técnica ACC siempre se recomienda aplicar en las muestras medioambientales para buscar relaciones directas entre las poblaciones y las variables de estudio. Para explicar las relaciones existentes entre las bacterias y aqueas se deben considerar los resultados de ambos estadísticos y analizarlos en conjunto. El uso del AC proporciona asociaciones lineales entre las variables en un espacio no restringido frente a un espacio restringido (donde busca soluciones el ACC). Muchas variables no tienen relación lineal directa, así que para saber si tiene alguna asociación es conveniente realizar un AC. El análisis de las asociaciones existentes en los datos, permite formular hipótesis que se puede contrastar en una etapa más avanzada de investigación.

Se procede a discutir los resultados en cuanto a las abundancias y relaciones con las variables operacionales y físico-químicas de la EDAR con respecto a las abundancias halladas en otros estudios y las relaciones con alguna variable físico-química u operacional si la hay en estudios realizados:

Dominio Arquea

Las abundancias de las arqueas fueron muy variables a lo largo del muestreo y además, los valores obtenidos fueron bajos. Entre los grupos funcionales de las

arqueas detectadas encontramos la presencia de las metanogénicas en abundancias casi indetectables y las AOA (las arqueas que oxidan amonio). Esto coincide con otros estudios como el de Gray *et al.*, (2002) que detectaron mediante la técnica DGGE bajas abundancias de arqueas metanogénicas en muestras de fangos activos de dos plantas convencionales de tratamiento de aguas. También con el uso de técnicas de secuenciación masiva se han hallado bajos porcentajes (0,05%) de abundancia de las arqueas metanogénicas en tanques aireados de fangos activos (Zhang *et al.*, 2012). Las AOA no pudieron ser cuantificadas pero la presencia de este grupo en sistemas de fangos activos coincide con un estudio donde se hallaron AOA en 5 EDAR analizadas con eliminación de compuestos orgánicos y nitrógeno (Park *et al.*, 2006). Estos tres estudios se realizaron en sistemas con bajas concentraciones de oxígeno y con largos tiempos de retención hidráulicos.

Gray *et al.*, (2002) determinan la presencia de arqueas metanogénicas con tiempos de retención hidráulico entre 6,5-13,6 h. Gómez *et al.*, (2010) obtiene tiempos de retención hidráulicos aun mayores de 8,05-15,27 h y Park *et al.*, (2006) de 24-61 h. Los tiempos de retención hidráulicos en que se operó la EDAR del Carraixet se situaron entre 5,3-6,9 h, por debajo de los anteriormente señalados. Los rangos de oxígeno disuelto en los reactores de la EDAR del Carraixet han estado entre 1,22 y 2,02 mg/L (Anexo 4). El rango de temperaturas registrado en la EDAR del Carraixet ha sido de 15-26,6°C, similar al del estudio de Gómez *et al.*, (2010) con un rango de 13-27°C.

La sonda ARCH915 hibrida con el 90% de la población de arqueas (Amann *et al.*, 2008), así que es posible que parte de la población de arqueas presente en las muestras de este estudio no sea hibridada con dicha sonda. Las metanogénicas detectadas (<1%) en las muestras de la EDAR del Carraixet tienen abundancias por debajo de las abundancias reportadas como arqueas (~ 3%). Es posible que en los tanques aireados de la EDAR del Carraixet, las arqueas presentes en su mayor proporción sean AOA.

Al realizar los análisis estadísticos se observa que para un sistema de aireación continua de fangos activos el tiempo de retención hidráulico correlaciona negativamente con las abundancias de las arqueas (tablas 26 y 28 de CCorA). Esto puede deberse a que la exposición prolongada de las arqueas a un medio con concentración de oxígeno superior a 1mg/L limite su proliferación.

Con el AC realizado (figura 92 y 95) observamos que las arqueas se asocian (interdependencia lineal) a la conductividad, el grupo de las metanogénicas se asocian (interdependencia lineal) al oxígeno disuelto, a la carga másica, al pH y a la población de metanotrofas. Los resultados del AC coinciden con otros estudios como en Torres-Alvarado *et al.*, (2013) que encontraron a la salinidad y concentración de sulfatos

como factores principales de la dinámica de las arqueas en los sedimentos, así como también hay estudios que correlacionan el pH (6,7-7,3) con la actividad de estos organismos (Griffin *et al.*, 1998; Hidalgo *et al.*, 2001). Las altas concentraciones de bacterias sulfato reductoras en las muestras de este estudio (presencia de alto contenido de sulfatos) inhibe la proliferación de las metanogénicas. Hidalgo *et al.*, (2001) y Muyzer *et al.*, (2008) estudiaron la competencia entre las bacterias sulfato reductoras y las arqueas metanogénicas, concluyendo que la presencia de sulfatos, pH alcalino y el sustrato limitante entre otros factores son los responsables de que dominen las bacterias sulfato reductoras sobre las arqueas metanogénicas, inclusive en medios o hábitats propios de las arqueas metanogénicas. También se ha observado que las altas concentraciones de iones Na^+ , Ca^{+2} y MoO_4^{-2} en aguas ricas en sulfato puede inhibir la actividad de las metanogénicas (Hidalgo *et al.*, 2001). En un medio tan diverso microbiológicamente como son las muestras de este estudio, la competencia de las metanogénicas por el alimento es otro factor que no favorece su proliferación.

Los ACC correspondientes (figura 93 y 97) indican que las arqueas se relacionan con altas cargas másicas, alta concentración de conductividad y alta concentración de DQO. Las arqueas requieren del acético al igual que muchas bacterias. La alta carga másica favorece que estos organismos no entren en competición con las bacterias. Los hábitats donde han sido identificadas las arqueas incluyen medios salinos, la conductividad puede favorecer a estos organismos frente a otros.

En base a los resultados de los estadísticos AC y ACC el rol de las arqueas en los fangos activos puede contribuir a la eliminación de carbono y producción de metano. El metano formado por las metanogénicas podría promover el crecimiento de las bacterias metanotrofas quienes participan en el ciclo del nitrógeno en los sistemas aireados de los fangos activos. La composición del agua residual es la clave para la composición de la comunidad de arqueas en los fangos activos (Gray *et al.*, 2002; Akarsubasi *et al.*, 2005; Gómez-Silvan *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos en cuanto abundancias de las arqueas, así como la presencia de AOA en las muestras estudiadas de una EDAR sin proceso de nitrificación y donde se suministró oxígeno superior a 1 mg/L, proporcionan un conocimiento básico para futuras investigaciones en cuanto a la presencia y abundancia de estos organismos y las variables que les influyen.

Dominio Bacterias

El phylum *Chloroflexi*. Es común en los procesos de fangos activos. La abundancia de este phylum en EDAR detectada por medio de FISH varía de <5 a un 30% (Serviouir y Nielsen, 2010). Las abundancias a lo largo del año de muestreo en la EDAR del Carraixet varían de un 3 a un 11%. Las dos sondas usadas para la identificación de las *Chloroflexi* hibridan altos porcentajes de las poblaciones de este

phylum de bacterias. La sonda CFX1223 cubre un 87% de estos organismos mientras que GNSB941 cubre un 94% (Loy *et al.*, 2007). La sonda CFX1223 detecta filamentos pertenecientes a los morfotipos 1851 (Beer *et al.*, 2002; Kragelund *et al.*, 2006), pocos miembros del morfotipo 0041 (Kragelund *et al.*, 2006) y algunos miembros del morfotipo 021N (Kragelund *et al.*, 2006). Las bacterias filamentosas de morfotipo 1851 se relacionan con baja carga másica, mientras que a las de morfotipo 0041 no solo se las relaciona con carga másica baja, también con alta edad de fango (GBS, 2008). A las filamentosas del morfotipo 021N se les relaciona con aguas con afluentes industriales, cargas másicas bajas, deficiencias de nitrógeno y sustratos fácilmente biodegradable (GBS, 2008).

En general a los miembros del phylum *Chloroflexi* se les relaciona con ambientes en donde los nutrientes y materia la orgánica son limitados, con bajas temperaturas y altas concentraciones de minerales (Yoon *et al.*, 2010). Sin embargo su temperatura de crecimiento en fangos activos se ha descrito con valores entre 15-35°C (Kragelund *et al.*, 2007). También se ha observado crecimiento de algunos *Chloroflexi* en medios de cultivos con temperatura superior a 37°C y pH entre 6-8,5 (Yoon *et al.*, 2010). En el correspondiente CCorA (tablas 26 y 28) hay una correlación de este phylum positiva con la temperatura y la edad de fango y una correlación negativa con la carga másica. En el AC (figura 92 y 95) se observa que hay una asociación (interdependencia lineal) con la temperatura. Con el ACC (figura 93 y 97) hay una relación directa entre el aumento de la abundancia de esta población y la alta edad de fango. Comparando los gráficos de variación (Figura 51) con detalle y las tablas de datos (tabla 12 y 13) se observa que las mayores abundancias de *Chloroflexi* se obtienen con edades de fango de 4,8-21,9 días, temperaturas entre 16,6 a 22 °C (temperaturas medias a lo largo del muestreo) y cargas másicas entre 0,14 y 0,38. Las abundancias de este phylum pueden estar determinadas en la EDAR del Carraixet por las altas edades de fango.

El phylum *Nitrospira*. La temperatura ejerce una gran influencia en la actividad y estructura de la población de *Nitrospira* en las plantas de tratamiento (Alawi *et al.*, 2009; Fujitani *et al.*, 2013). La temperatura óptima para la nitrificación es de 25-31°C y la temperatura optima de *Nitrospira defluvii* es de 32°C (Fujitani *et al.*, 2013). Otros miembros del phylum *Nitrospira* tienen temperaturas de crecimiento entre 39 °C y 42°C (Edwards *et al.*, 2013). En general las abundancias que se suelen encontrar de estos organismos son bajas. Sanapareddy *et al.*, (2008) detectaron mediante pirosecuenciación abundancias por debajo del 5% y Wang *et al.*, (2010) obtuvieron una concentración del 3,4% del total de la población de *Nitrospira* por la técnica T-RFLP. En el presente trabajo el promedio a lo largo del muestreo de la abundancia de *Nitrospira* está cerca del 2% de la población total. Se debe tener en cuenta que la sonda Ntspa712 hibrida con el 56% de los organismos de este phylum (Loy *et al.*, 2007), por lo que posiblemente la población de este phylum de bacterias sea más

abundante que la registrada. Este phylum está presente y activo en ambientes con bajas concentraciones de oxígeno (Park *et al.*, 2008). Por las características genómicas que presenta *Nitrospira* se plantea la hipótesis que están en la mayoría de los ecosistemas nitrificantes y bien adaptados a la hipoxia ambiental (Lücker *et al.*, 2010). La falta de mecanismos de protección ante el estrés oxidativo en las *Nitrospira* sugiere, que para mantener estable la población de este phylum se debe tener un buen control en la aireación para mantener concentraciones de oxígeno bajas (Lücker *et al.*, 2010).

En el análisis CCorA (tabla 26 y 28) se ve que existe una correlación positiva de este phylum con la temperatura y la edad de fango y una correlación negativa con la carga másica. Las *Nitrospira* son bacterias autótrofas de lento crecimiento, estas requieren de edades de fango largo para poder proliferar, las altas cargas másicas favorecen a las bacterias heterótrofas que son más rápidas metabólicamente. Con el AC (figura 92 y 95) se muestra una asociación de las *Nitrospira* con la temperatura, pero con el ACC no se determina una relación directa con ninguna variable. Observando las tablas de datos (tablas 12 y 13) y las gráficas de variación (Figura 66) vemos que las mayores abundancias de esta población, se encuentran con edades de fango entre 6,10 y 15,77 días y con temperaturas de 22 °C a 26,6°C (las mayores temperaturas medidas) y carga másica entre 0,1 y 0,4. Es posible que este phylum requiera edades de fango elevadas, pero la variable que más le influye según los análisis realizados es la temperatura.

El phylum *Proteobacteria*. Es el grupo dominante de bacterias en las EDAR con el sistema de fangos activos que tratan aguas residuales urbanas. Entre las clases que comprende este phylum, la más abundante en los fangos activos es β -*Proteobacteria*, seguida de α -*Proteobacteria* o de γ -*Proteobacteria* (Sanapareddy *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2013).

En un estudio con FISH se identificó que las β -*Proteobacteria* más abundantes en los fangos activos eran el complejo *Azoarcus-Thauera*, éstas bacterias se han identificado como las bacterias desnitrificantes más abundantes en las EDAR industriales (Wagner *et al.*, 2002). Esto coincide con los resultados que se han obtenido en la EDAR del Carraixet, donde la clase más abundante ha sido β -*Proteobacteria* y dentro de esta clase el grupo funcional compuesto por el complejo *Azoarcus-Thauera* entre los géneros más abundantes identificados.

Con referencias a las *Proteobacteria* la información con la que se cuenta en bibliográfica depende de cada miembro ya sea género o incluso especie. Es difícil contar con información de las características generales del phylum incluso de cada clase. Este phylum cuenta con un gran número de géneros y especies con características muy diversas. En general no hay información disponible de las

Proteobacteria que definan las características generales para su crecimiento y proliferación en ambientes y condiciones específicos.

Las α -*Proteobacteria* se encuentran en hábitats con bajas concentraciones de oxígeno disuelto y muchos de sus miembros se encuentran en ambientes marinos e hipersalinos (Imhoff, 2006). La temperatura óptima así como el pH y otras características dependen de cada miembro (Imhoff, 2006). Las abundancias promedio de la clase α -*Proteobacteria* detectadas en las muestras de la EDAR del Carraixet han sido ~18% a lo largo del muestreo. Considerando que la sonda hibrida el 81% de las bacterias de esta clase (Amann *et al.*, 2008), podría ser algo mayor el porcentaje de abundancia hallado en las muestras.

Las β -*Proteobacteria* son metabólicamente flexibles y crecen en ambientes ricos o pobres de oxígeno, e incluso en ambientes anaerobios (Imhoff, 2006). Al igual que las α -*Proteobacteria* encontramos muchas diferencias entre sus características de crecimiento o condiciones de su hábitat. Las β -*Proteobacteria* en las muestras de la EDAR de Carraixet han representado un porcentaje promedio de ~ 32%. La sonda utilizada para la detección de esta clase hibrida el 86% de la población de β -*Proteobacteria* (Amann *et al.*, 2008).

El porcentaje promedio que se detecta de γ -*Proteobacteria* en las muestras de la EDAR del Carraixet es del ~14%. La sonda utilizada para las γ -*Proteobacteria* cubre el 76% de la población perteneciente a esta clase (Amann *et al.*, 2008). En las hibridaciones de γ -*Proteobacteria* se observó que las mayores abundancias se asociaban con la presencia de las γ -*Proteobacteria* en forma de cocobacilos y las abundancias altas coincidían con los meses de noviembre, diciembre y enero (figura 96 análisis ACC y observación microscópica). En estos meses se realiza la recolección de la chufa, un tubérculo característico de la zona. Durante la recolección y lavado de este tubérculo se lleva a cabo el desecho de las raíces, limpieza de la piel y la eliminación de los tubérculos, que no cumplen con el control de calidad, por lo que las aguas industriales que llegan a la EDAR en estos meses proceden en su mayoría del lavado industrial de la producción de la chufa. Las γ -*Proteobacteria* con el CCorA se correlacionan positivamente con el oxígeno disuelto.

El último grupo identificado de las *Proteobacteria* son las δ -*Proteobacteria*. El porcentaje de abundancia en promedio de las δ -*Proteobacteria* es de ~2%. Con el uso conjunto de las sondas DELTA495 (a,b,c y competidoras) se llega a hibridar el 75% de la población de este grupo de bacterias (Lücker *et al.*, 2007). El uso conjunto de estas sondas no hibrida parte de esta clase de bacterias, por lo que el porcentaje real de estas bacterias puede ser mayor del 2%.

El phylum *Planctomycetes*. Los miembros del phylum *Planctomycetes* se consideraban heterótrofos, pero en un estudio en biorreactores anaerobios para la oxidación del amonio (annammox) se hallaron miembros de *Planctomycetes* como parte de los miembros dominantes de la comunidad (Chouari et al., 2003; Fuerst et al., 2004). El phylum *Planctomycetes* se encuentran en los fangos activos (diferente al proceso annammox) con abundancias bajas, menores del 10% aproximadamente (Sanapareddy et al., 2009; Wang et al., 2010; Zhang et al., 2012). En las muestras del presente estudio se determinó un promedio cerca del 5% de *Planctomycetes*. La sonda PLA46 hibrida un 44% de organismos pertenecientes al phylum *Planctomycetes* (Amann et al., 2008). Las abundancias de este phylum detectados en este trabajo pueden ser mayores.

En los estadísticos realizados (CCorA, AC y ACC) no se halla una variable determinante que influya en las abundancias de *Planctomycetes*. Con el CCorA se obtiene una correlación positiva con la temperatura, edad de fango, nitrógeno total, fósforo total, DQOtotal y SSV. Con el estadístico AC obtenemos una asociación con la temperatura y, con el ACC se obtiene una relación lineal con la temperatura, pH y conductividad. Por el momento no se cuenta con información suficiente de este phylum, aunque en base a los resultados en este trabajo la temperatura sería la variable que tiene más influencia sobre este phylum en sistemas de fangos activos con aireación continua.

Grupos funcionales. Los grupos funcionales que se hallaron en las muestras de la EDAR del Carraixet corresponden a bacterias formadoras de tétradas (TFO) correspondientes a *Defluvicoccus cluster 2* (α -*Proteobacteria*); A bacterias desnitrificantes identificadas por el complejo *Azoarcus-Thauera* en su mayoría; A PAO correspondiente a *Candidatus 'Acumutibacter phosphatis'*. Los miembros de estos 2 grupos (desnitrificantes y PAO) pertenecen a la clase β -*Proteobacteria*; A GAO correspondientes a *Candidatus 'Competibacter phosphatis'*, integrante de las γ -*Proteobacteria*; A las bacterias SRB cuyos miembros mayormente pertenecen a la clase δ -*Proteobacteria*; A los grupos AOB; y a bacterias metanotrofas, cuyos miembros están en más de una clase taxonómica.

Para las α -*Proteobacteria* las correlaciones halladas con el CCorA (tabla 26 y 28) fueron positivas con pH y conductividad y, correlaciones negativas con el fósforo total. Las TFO (*Defluvicoccus cluster 2*) se correlacionan positivamente con el oxígeno disuelto, carga másica y conductividad (tabla 30 y 32). Schroeder et al., (2008) detectaron que en la parte aireada de los sistemas EBPR los miembros GAO que dominaban pertenecían a *Defluvicoccus* (cluster 2). Es posible que valores altos de oxígeno favorezcan a este género sobre los demás miembros GAO.

En las EDAR se ha determinado una concentración de *Azoarcus* entre el 3-16% y de *Thauera* de 2-11% (Thompson *et al.*, 2007). El crecimiento de estos dos géneros depende del tipo de sustrato (Garrity *et al.*, 2007). Las bacterias **desnitrificantes** halladas en las muestras de la EDAR del Carraixet han sido un conjunto (*Azoarcus-Thauera*) con una abundancia promedio de $\sim 13\%$. Las β -*Proteobacteria* tienen correlación negativa en el CCorA (tabla 26) con las variables temperatura y edad de fango, y una correlación positiva con la carga másica. Las bacterias desnitrificantes (*Azoarcus-Thauera*) halladas en las muestras correlacionan de manera similar que las β -*Proteobacteria* excepto por la correlación con la temperatura (tabla 30). Es posible que estas bacterias entren en competencia con otras bacterias heterótrofas que se desarrollen más fácilmente a largas edades de fango por el alimento, por lo que en edades de fango prolongadas se vean desfavorecidas. Las bacterias **PAO** (*Rhodocyclus*), tienen correlación positiva en el análisis CCorA (tabla 32) con fósforo total y con la DQO total y, correlación negativa con la conductividad. En el AC (figura 95) las β -*Proteobacteria* están asociadas (interdependencia lineal) con la conductividad al igual que las bacterias desnitrificantes (figura 102). Con el ACC (figura 93 y 97) las β -*Proteobacteria* están relacionadas (lineal) positivamente con la conductividad y con la DQO total. Las bacterias desnitrificantes (*Azoarcus*, *Thauera*) se relacionan (linealmente) también positivamente con la conductividad (figura 103). Las PAO presentan asociación (interdependencia lineal) positiva en el AC con altas concentraciones de fósforo total, DQO total y SSV.

Las desnitrificantes (*Azoarcus*, *Thauera*) halladas en las muestras analizadas representan en promedio el 40% de las abundancias de las β -*Proteobacteria* detectadas. En los análisis estadísticos (CCor, AC y ACC) se observa que las correlaciones entre las β -*Proteobacteria* y las desnitrificantes coinciden en que la conductividad (alta concentración) es la variable que juega un papel importante para las altas abundancias que presentan. Con las bacterias PAO las variables a tener en cuenta son el fósforo total y los SSV. Las PAO requieren fosfatos para poder metabolizarse así como del sustrato con el que se les relaciona, el acético, producto final de la hidrólisis y fermentación de otras bacterias como las acidogénicas /acetogénicas.

Las **GAO** (*Candidatus 'Competibacter phosphatis'*) se correlacionan positivamente con el oxígeno disuelto, carga másica, conductividad y negativamente con el pH (tabla 30 y 32). Con el AC vemos que las γ -*Proteobacteria* se asocian con las variables DQO, SSV, nitrógeno total y fósforo total (figura 95), mientras que las GAO se asocian con el pH, oxígeno disuelto y la carga másica (figura 99 y 102). Siendo las abundancias casi nulas de este grupo, es recomendable considerar estos resultados como coincidencias estadísticas y realizar un estudio donde las presencias de GAO sean cuantificables.

Las **SRB** del grupo *δ-Proteobacteria* (*Desulfonema spp.*) se correlacionan positivamente con el nitrógeno total, fósforo total, DQO total y SSV; mientras que con la temperatura y pH se correlacionan negativamente (tabla 26 y 28). Con el AC (figura 95) las *δ-Proteobacteria* se asocian (interdependencia lineal) con el pH, posiblemente positiva ya que un pH elevado (alcalino) favorece el proceso de reducción de sulfatos mientras que un pH menor de 7,7 inhibe la presencia de las SRB por la presencia de H₂S. *Desulfonema* tiene asociación (interpedendiente lineal) con la conductividad (figura 102). El ACC (figura 103) muestra una relación directa lineal de las abundancias de *Desulfonema* con la conductividad. El porcentaje de abundancia en promedio de las *δ-Proteobacteria* en el presente estudio es del ~2%, muy por debajo de las abundancias promedio de las SRB *δ-Proteobacteria* (~5%). Con el uso conjunto de las sondas DELTA495 (a,b,c y competidoras) se llega a hibridar el 75% de la población de este grupo de bacterias (Lücker *et al.*, 2007). Los resultados de los estadísticos entre *δ-Proteobacteria* y *Desulfonema* no coinciden. Observamos en resultados del AC y ACC que la conductividad es la variable con la que se ve favorecida *Desulfonema* en las muestras analizadas. Esto coincide con lo que reportan Fukui *et al.*, (1999); las bacterias *Desulfonema* requieren de medios salinos para su proliferación, también se observó que su pH óptimo para su crecimiento era el neutro.

Se detectan altos porcentajes de bacterias SRB. Las sondas de las SRB (SRB385 y SRB385Db) hibridan cerca del 70% de las *δ-Proteobacteria* (Loy *et al.*, 2007) y muchas otras bacterias pertenecientes a otros phylum como es en el caso del phylum *Chlorobi* (78,5%), que se hibrida también con la sonda SRB385Db o miembros del phylum *Nitrospira* (42,8%) que hibridan con la sonda SRB385. El grupo SRB es filogenéticamente diverso, hallándose algunos miembros en *Nitrospira*. Sin embargo en el phylum *Chlorobi* la mayoría de sus representantes son bacterias oxidadoras de azufre. Parte de las abundancias detectadas con las sondas de SRB (SRB385 y SRB385Db) pueden pertenecer a otras bacterias diferentes de las sulfato reductoras. El uso conjunto de las sondas específicas para la detección de las bacterias sulfato reductoras de la clase *δ-Proteobacteria* no garantiza detectar todo este grupo. Las especificidades de cada sonda para cada familia o género son diversas. Las especificidades de las sondas usadas en este trabajo son (Loy *et al.*, 2007): Dsb804, hibrida con algunas *Desulfobacteraceae* con una especificidad del 32,9% con la familia *Desulfobacteraceae*; DNMA657, hibrida con algunas *Desulfonema* especificidad del 41,8% con el género *Desulfonema*; DBB660, hibrida con *Desulfobulbus*, especificidad del 59,6% con el género *Desulfobulbus*; DSV687, hibrida con muchas *Desulfovibrionales*, especificidad del 25,1% con la clase *δ-Proteobacteria* y del 90,1% con el orden *Desulfovibrionales*. El género *Desulfotomaculum* perteneciente a las SRB dentro del phylum *Firmicutes* tampoco cuenta con una sonda con una elevada especificidad (Loy *et al.*, 2007): Dtm230, hibrida muchas *Desulfotomaculum*. Con una especificidad del 54,3% con el género *Desulfotomaculum*.

Las SRB pertenecen a varios grupos taxonómicos y las especificidades de las sondas existentes son bajas, esto impide tener una detección más fiable. Las bacterias que se hibridan con la sonda SRB385 solo presentan relación mediante el análisis ACC con la DQO total y los SSV (figura 103). Es posible que la población que hibrida esta sonda sea introducida con el agua de entrada. Las bacterias que hibridan con la sonda SRB385Db, presentan correlaciones negativas mediante el CCorA (tabla 30 y 32) con la conductividad, el oxígeno disuelto y la carga másica. Entre las bacterias desnitrificantes detectadas en las muestras y las SRB detectadas con la sonda SRB385Db presentan correlaciones inversas, estos dos grupos pueden tener competencia entre ellos. Esto lo confirma la asociación (interdependencia lineal) posiblemente positiva de las bacterias hibridadas con SRB385Db con la edad de fango. Esta variable afecta negativamente a las bacterias desnitrificantes.

Los grupos **AOB** y bacterias **metanotrofas** están compuestos por miembros del phylum *Proteobacteria* (más de una clase de *Proteobacteria*). Las AOB tienen una correlación positiva con la conductividad y negativa con el tiempo de retención hidráulico (Tabla 30 y 32 del CCorA). Esto coincide con Ward *et al.*, (2007) que encontraron una correlación positiva con las AOB y la salinidad. Miembros como *Nitrosomonas*, *Nitrosolobus* y *Nitrospira* son miembros del grupo AOB que pertenecen a la clase β -*Proteobacteria*. Es posible que estos géneros sean los presentes en el grupo AOB en las muestras de este estudio.

Las bacterias metanotrofas correlacionan positivamente con el oxígeno disuelto y con la carga másica (tabla 30). Se asocian (AC) con el oxígeno disuelto, carga másica y pH (figura 99 y 102). Con el ACC se puede ver que tienen relación lineal con el nitrógeno total y el pH (figura 103). Esto coincide con previas investigaciones donde se les asocia a concentraciones de metano, oxígeno y nitrato para que proliferen (Graham *et al.*, 1993; Amaral *et al.*, 1995; Hanson y Hanson 1996; Henckel *et al.*, 2000). Las metanotrofas en nuestros resultados se asocian (interdependencia lineal) positivamente a las arqueas metanogénicas ya que requieren del metano, oxígeno y nitratos para realizar la fijación del nitrógeno (N_2) como quedó explicado en la parte de la introducción de este trabajo.

Las AOB y las bacterias metanotrofas no se pueden comparar con los comportamientos de un phylum o clase específico por la diversidad de sus miembros.

Las variaciones de las diferentes poblaciones bacterianas estudiadas en ambas líneas se esperaba que fueran similares, ya que las diferencias en los parámetros tanto operacionales como físico-químicos eran pequeñas entre las dos líneas analizadas; sin embargo las comunidades de δ -*Proteobacteria*, GAO (*Deffluvicoccus*), y la población de sulfato reductoras (*Desulfonema* y las detectadas con la sonda SRB385) han

presentado comportamientos diferentes entre las líneas. En el caso de las δ -*Proteobacteria* en la línea 1 se presentó mayor variabilidad de abundancia que en la línea 2. En las gráficas de la variación de la población de las bacterias *Deftuicoccus* (figura 73) se puede ver en varias muestras hay un comportamiento asimétrico entre las líneas. La sulfato reductora *Desulfonema* presenta distinta variabilidad entre las líneas (figura 78), las mayores abundancias detectadas se presentan en la línea 1. Con la sonda SRB385 las abundancias de las bacterias que hibridan son diferentes entre líneas (figura 79).

La técnica FISH se utiliza en estudios filogenéticos, ecológicos, ambientales y de diagnóstico, porque además de la identificación con la sonda específica ofrece información sobre la distribución espacial de las células microbianas. Esta técnica presenta algunas limitaciones como son:

- Los porcentajes de especificidad en las hibridaciones de cada sonda. En muchas de las sondas los porcentajes son inferiores al 80%, lo que limita la cuantificación total de la población objeto de estudio.
- Los problemas que se presentan al tratar las imágenes. Las cuantificaciones se basan en programas informáticos. Estos realizan la cuantificación por píxeles, considerando que muchas de las muestras ambientales y sobre todo en tratamientos de aguas hay interferencias en cuanto a posibles falsos positivos como falsos negativos, la mayoría de las veces los falsos positivos dan píxeles semejantes a los organismos, ocasionando errores en la cuantificación.
- En las poblaciones con pocas abundancias muchas veces son visibles en el microscopio pero cuando se hace la captura de las fotos se pierde calidad de imagen y muchas de las células se pierden en la señal de fondo. Esto ocasiona que el programa no reconozca los píxeles específicos de las células por lo que el ajuste de los parámetros se hace tedioso y muchas veces no se logra ajustar.

En resumen la técnica FISH debe ser considerada como una técnica orientativa para conocer las abundancias de las poblaciones analizadas, especialmente en estudios como este en el que se examina toda la diversidad microbiana.

Dominio Eukarya

Protozoos. Desde nuestro conocimiento no existen estudios donde se obtengan relaciones entre las comunidades de bacterias y arqueas con las comunidades de protozoos. Sí que hay una abundante bibliografía sobre las comunidades de protozoos como indicadores de las condiciones operacionales de las EDAR. Resulta interesante conocer si las comunidades de protozoos comparten características con los miembros de las comunidades de bacterias y arqueas respecto a las variables operacionales y

físico-químicas. Las mayores asociaciones se ven con las comunidades de *Chlorofelxi*, PAO y las SRB que se detecta con las sonda SRB385Db. Los datos obtenidos en esta tesis suponen tan solo un estudio preliminar para una futura línea de investigación. Hacen falta más estudios sobre estas posibles relaciones que se pudieran dar entre las comunidades microbianas

Hongos. Las formas de media luna (figura 88) hibridaron con la sonda perteneciente al dominio Eucariota (EUK mix). Para la identificación de la posición taxonómica de estos morfotipos celulares dentro de Eucariota también se hibridó con sondas específicas, tales como sondas que identifican algas (Clorofitas y no Clorofitas) y levaduras (sonda general de levaduras). Las hibridaciones positivas fueron con la sonda de levaduras (PF2). Esta sonda también da señal positiva con hongos de la división *Ascomycata* (*Ascomycetos*), dentro de los *Ascomycetos* está el género *Fusarium* y las formas de media luna presentes en las muestras corresponderían a esporas de hongos posiblemente de *Fusarium*. *Fusarium* es uno de los hongos más conocidos por problemas de patógenos en la agricultura. Puede llegar a afectar tanto a los humanos como a los animales (Nelson *et al.*, 1983). *Fusarium* es un género cuyas esporas se caracterizan por las formas de media luna (Domsch *et al.*, 1980; Nwama *et al.*, 1993). Para su crecimiento y esporulación, *Fusarium sp.* es favorecido por la luz y por las fluctuaciones de temperatura (Nelson *et al.*, 1983). Las especies de *Fusarium* que se pueden encontrar en las raíces de las plantas son: *F. acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. compactum*, *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum* y *F. solani* (Leslie *et al.*, 2006). La presencia de este hongo en el reactor de fangos activos posiblemente estaría relacionada con la actividad de la agricultura de la zona. Es posible que tenga relación con la chufa (tubérculo), que es una de las producciones que se da en la zona y cuyas aguas de su procesado forman parte del agua residual de entrada de la EDAR.

Se ha detectado que *Fusarium sp.* tiene actividad enzimática extracelular (Kwon *et al.*, 2007). Varios miembros de este género tienen capacidad para producir β -glucosidasa, amilasa, pectinasa y xylanasa (Kwon *et al.*, 2007). Las actividades enzimáticas detectadas en las formas de media luna han sido glucoronidasa y fosfatasa. La glucuronidasa es una enzima que cataliza la descomposición de los hidratos de carbono y la fosfatasa cataliza la eliminación de grupos fósforos. También presentaron capacidad de acumular PHB. La acumulación de PHB puede ser similar al encontrado en el metabolismo presente en las bacterias PAO. Por la variedad en la microbiota, en la EDAR del Carraixet es posible que la eliminación del fósforo (anexo 4) que se realiza en la planta (sin ser diseñada para la eliminación del fósforo) sea debida a la acción de miembros no pertenecientes a las bacterias PAO como posiblemente el hongo *Fusarium spp.*

Conclusiones

6 Conclusiones

1. La técnica FISH es la más adecuada para estudiar la dinámica poblacional bacteriana, si lo que se pretende es conocer las abundancias aproximadas y determinar la distribución espacial de las poblaciones de bacterias y arqueas más representativas en las muestras de fangos activos dentro del flóculo.
2. En los porcentajes de abundancia de las poblaciones siempre que sean detectadas por la técnica FISH se debe considerar el tipo de células que se está hibridando. La diferencia entre las células Gram positiva y Gram negativa hace complicada la detección simultánea de la población total de bacterias y arqueas presentes en las muestras. Hace falta un estudio para adaptar los protocolos de fijación y permeabilización enzimática para llegar a cubrir simultáneamente células Gram negativas y Gram positivas. Cada tipo de muestra presenta complejidades diferentes por lo que los tratamientos variarán dependiendo del tipo de muestra a analizar.
3. En la EDAR de la Cuenca del Carraixet, con parámetros operacionales y físico-químicos similares en las 2 líneas de aguas, existe una dinámica poblacional diferente entre ambas líneas.
4. El conocimiento de la presencia y abundancia de las arqueas dentro de los sistemas de fangos activos con aireación continua es aún limitado. Las arqueas presentes en las muestra de fangos activos son diversas, ya que además de poblaciones de metanogénicas se han detectado también poblaciones de arqueas que oxidan el amonio (AOA).
5. En sistemas de fangos activos con aireación continua los rangos de trabajo en los parámetros operacionales determinarán la composición de la población a nivel de phylum o clase de bacteria y arquea. En el sistema de fangos activos de la EDAR de la cuenca del Carraixet, se ha detectado arqueas a concentraciones de oxígeno superiores al 1mg/L, lo que descarta al oxígeno como factor inhibidor. En el caso de las *Chloroflexi* en sistemas de fangos activos con aireación continua donde la carga másica esta en rangos medios, la variable determinante es la edad de fango.
6. De todas las bacterias y arqueas presentes en las muestras, tan sólo se han identificado como pertenecientes a algún grupo funcional aproximadamente el 50 %. El resto corresponde posiblemente a bacterias

heterótrofas, que por ser un grupo metabólico de elevada diversidad taxonómica, carece de sondas generales que hibriden sobre él.

7. La componente industrial del agua residual es determinante para la proliferación de ciertos géneros. El agua procedente del sector agrícola puede ser la causa de la presencia de bacterias cocobacilares de la clase γ -*Proteobacteria* y de ascosporas del phylum *Ascomycota* en las muestras de la EDAR de la Cuenca del Carraixet.
8. Se han encontrado relaciones directas entre las comunidades de protozoos y las comunidades de bacterias y arqueas. La comunidad SRB detectada con la sonda SRB385Db es la que mayor relación tiene con los protozoos.
9. Se ha encontrado esporas del phylum *Ascomycota* en las muestras de la EDAR de la Cuenca del Carraixet asociadas al lavado de la chufa. El papel de estos organismos en la EDAR pueden estar relacionado con la eliminación de materia orgánica presente en las aguas.
10. Hay pocos estudios que engloban comunidades de bacterias, arqueas, protozoos y otros organismos simultáneamente en los fangos activos. En las dos líneas de aguas de la EDAR de la Cuenca del Carraixet se ha podido determinar las relaciones lineales entre bacterias y arqueas con las diferentes variables físico-químicas y operacionales. Esto podría permitir una optimización del proceso de depuración.

Bibliografía

7 Bibliografía

- Adav S.S., Lee D-J., Lai J.Y. (2010). Microbial community of acetate utilizing denitrifiers in aerobic granules. *Appl. Microbiol Biotechnol*, 85, 753-762.
- Ahn J., Schroeder S., Beer M., McIlroy S., Bayly R., May J., Vasiliadis G., Seviour R. (2007). Ecology of the Microbial Community Removing Phosphate from wastewater under continuously aerobic conditions in a Sequencing Batch Reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 2257-2270.
- Akarsubasi A., Ince O., Kirdar B., Oz N., Orhon D., Curtis T., Head I., Ince B. (2005). Effect of wastewater composition on archaeal population diversity. *Water Research*, 39, 1576-1584.
- Aker A., Akkaya E., Yesiladali S. (2006). Accumulation of Polyhydroxyalkanoates by *Micrococcus phosphovorans* under various growth conditions. *J. Ind. Microbiol Biotechnol*, 33, 215-320.
- Alawi M., Off S., Kaya M., Spieck E. (2009). Temperature influences the population structure of nitrite-oxidizing bacteria in activated sludge. *Environmental Microbiology Reports*, 1, 184-190.
- Alonso J.L., Borrás L., Amorós I. (2009). Improved in situ hybridization efficiency of nitrifying bacteria with locked-nucleic-acid incorporated DNA probe. *Specialised Conference on Microbial Population Dynamics in Biological. Aalborg Dinamarca: ASPD5 IWA Int.*
- Amann R. I., Binder B. J., Olsen R. J., Chisholm S. W., Devereux R., Stahl D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol*, 56, 1919-1925.
- Amann R., Fuchs B. M. (2008). Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nature reviews Microbiology*, 6, 339-348.
- Amann R., Ludwig W., Scheleifer K. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews*, 59, 143-169.
- Amaral J.A., Archambault C., Richards S.R., Knowles R. (1995). Denitrification associated with groups I and II methanotrophs in a gradient enrichment systems. *FEMS Microbiology Ecology*, 18, 289-298.

- Anzola P., Oliveira A. Zaiat M. (2008). Actividad metanogénica específica en un reactor anaerobio-aerobio aplicado al tratamiento de agua residual doméstica. *Interciencia*, 33, 284-289.
- Arregue L., Muñoz C., Guinea A., Serrano S. (2003). FLUTAX employment simplifies the visualization of the ciliature of oxytrichid hypotrichs. *Eur. J. Protistol*, 39, 169-172.
- Badii M. H., Castillo J., Cortez K., Wong A., Villalpando P. (2007). Análisis de correlación canónica (ACC) e investigación científica. *InnOvaciOnes de NegOciOs*, 4, 405-422.
- Bak F., Pfennig N. (1991). Microbial sulfate reduction in littoral sediment of Lake Constance. *FEMS Microbiol Ecol*, 85, 31-42.
- Baker B.J., Hugenholtz P., Dawson S.C., Banfield J.F. (2003). Extremely acidophilic protists host Rickettsiales-lineage endosymbionts with an intervening sequence in their 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol*, 69, 5512-5518.
- Balch W. E., Fox G.E., Magnum L.J., Woese C.R, Wolfe R.S. (1979). Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol*, 43, 260-296.
- Balows A., Truper G., Dworkin M., Harderik W., Schleifer K. (1992). The prokaryotes. En B. F. Widdel F. (Ed.), *A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications* 4, 3352-3376).
- Barajas López, M. G. (2002). *Eliminación biológica de nutrientes en un reactor biológico secuencial. Caracterización y estimulación de las fuentes de carbono del agua urbana*. Barcelona, España: Universidad Politécnica de Cataluña.
- Barns S.M., Takala S.L., Kuske C.R. (1999). Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom *Acidobacterium* in the environment. *Appl. Environ Microbiol*, 65, 1731-1737.
- Barr J., Blackall L., Bond P. (2010). Further limitations of phylogenetic group-specific probes used for detection of bacteria in environmental samples. *The ISME Journal*, 4, 959-961.
- Barr J. J, Blackall L. L., Bond P. (2010). Further limitations of phylogenetic group-specific probes used for detection of bacteria in environmental samples. *The ISME Journal*, 959-961.
- Barton L., Tomei F. (1995). *Characteristic and activities of sulfate-reducing bacteria*. New York: Plenum.

- Baumann B., Snozzi M., Zehnder A., van der Meer J R. (1996). Dynamics of denitrification activity of *Paracoccus denitrificans* in continuous culture during aerobic-anaerobic changes. *J Bacteriol.*, 178, 4367–4374.
- Beer M., Kong Y., Seviour R. (2004). Are some putative glycogen accumulating organisms (GAO) in anaerobic:aerobic activated sludge systems members of the Alphaproteobacteria? *Microbiology*, 150, 2267-2275.
- Beer M., Seviour E., Kong Y., Cunningham M., Blackall L., Seviour R. (2002). Phylogeny of the filamentous bacterium Eikelboom Type 1851, and desing and application of a 16S rRNA targeted oligonucleotide probe for its fluorescence in situ identification in activated sludge. *FEMS Microbiology*, 207, 179-183.
- Beker S., Ferguson S., Ludwig B., Page M., Richter O-H., van Spanning R. (1998). Molecular Genetics of the Genus *Paracoccus*: Metabolically Versatile Bacteria with Bioenergetic Flexibility. *Microbiol. Mo.Biol. Rev.*, 62, 1046–1078.
- Benoit J., Gilmour C., Mason P. (2001). Aspects of Bioavailability of Mercury for Methylation in pure cultures of *Desulfobulbus propionicus* (1pr3). *Appl Environ Microbiol*, 67, 51-58.
- Bitton G. (1994). *Wastewater Microbiology*. New York: Wiley-Liss.
- Björnsson L., Hugenholtz P., Tyson G., Blackall L. (2002). Filamentous *Chloroflexi* (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. *Microbiology*, 148, 2309-2318.
- Bond P.L., Hugenholtz P., Kelly J., Blackall L.L. (1995). Bacterial community structures of Phosphate-Removing and Non-Phosphate-Removing activated sludges from sequencing Batch reactors. *Appl Environ Microbiol*, 61, 1910-1916.
- Boone D.R., Whitman W.B. (1988). Proposal of minimal standards for describing new taxa of methanogenic bacteria. *int J Syst Bacteriol*, 38, 212-219.
- Boone D.R., Whitman W.B., Rouvire P. (1993). *Diversity and taxonomy of methanogens*. In *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics* (ed. J.G. Jerry). New York: Chapman and Hall.
- Borrás L. (2008). Técnicas microbiológicas aplicadas a la identificación y cuantificación de microorganismos presentes en sistemas EBPR. *Tesis Doctoral*. Valencia, España: Universidad Politécnica de Valencia.
- Bourne D., Holmes A., Iversen N., Murrell J. (2000). Fluorescent oligonucleotide rDNA probes for specific detection of methane oxidising bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 31, 29-38.

- Brauman A., Matthew d., Labat M., Breznak J. (1992). Genesis of acetate and methane by Gut Bacteria of nutritionally diverse termites. *Science*, 257, 1384-1387.
- Brusseau G.A., Bulygina E.S., Hanson R.S. (1994). Phylogenetic analysis and development of probes for differentiating methylotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol*, 60, 626-636.
- Bult C., White O., Olsen g. and 37 other authors. (1996). Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science*, 273, 1058-1073.
- Buzzini A., Sakamoto I., Varesche M., Pires E. (2006). Evaluation of the microbial diversity in an UASB reactor treating wastewater from an unbleached pulp plant. *Process Biochemistry*, 41, 168-176.
- Cardenas L.P., Sastoque A.M., Peña M.R. (2006). Molecular biology methods in environmental samples: a tool to establish the relationship between the structure of microbial communities and the environmental conditions in engineered systems (a short review). *Water and Environmental Management Series (WEMS): International Conference on Multiple Uses of Water for Life and Sustainable Development* (págs. 57-62). London. UK.: IWA Publishing.
- Castro H., Williams N., Orgam A. (2000). Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 31, 1-9.
- Catalán Lafuente G.J. (1997). *Depuradoras bases científicas*. Madrid: Bellisco.
- Chang Y., Peacock D., Long E., Stephen R., Mckinley P., Macnaughton J., Hussain A., Saxton M, White D. (2001). Diversity and Characterization of sulfate-reducing bacteria in groundwater at a Uranium mill tailigs site. *Appl Environ Microbil*, 67, 3149-3160.
- Chatton, E. (1925). "Pansporella perplexa. Reflexions sur la biologie et la phylogénie des portozoaires" *Annales des Sciences Naturelles. Zoologie et Biologie Animale.*, 10, 1-84.
- Chouari R., Le Paslier D., Daegelen P., Ginestet P., Weissenbach J., Sghir A. (2003). Molecular evidence for novel *Plactomycete* diversity in a municipal wastewater treatment plant. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 7354-7363.
- Çiğgin A., Rossetti S., Majone M., Orhon D. (2011). Effect of feeding and sludge age on acclimated bacterial community and fate of slowly biodegradable substrate. *Bioresource Technology*, 102, 7794-7801.

- Crocetti G., Banfield J., Keller J., Bond P., Blackall L. (2002). Glycogen-Accumulating Organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes. *Microbiology*, 148, 3353-3364.
- Crocetti G., Hugenholtz P., Bond P., Schuler A., Keller J., Jenkins D. and Blackall L. (2000). Identification of Polyphosphate-Accumulating Organisms and desing or 16rRNA-Directed probes for their detection and quantification. *Appl Environ Microbial*, 66, 1175-1182.
- Crocetti G., Murto M., Björnsson L. (2006). An update and optimisation of oligonucleotide probes tarjeting methanogenic Archaea for use in fluorescence in situ Hybridisation (FISH). *Journal of microbiological methods*, 65, 194-201.
- Daims H., Bruhl A., Amann R., Scheifer K-H., Wagner M. (1999). The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Environ Microbiol*, 22, 434-444.
- Daims H., Nielsen J., Nielsen P., Schleifer K., Wagner M. (2001). In situ characterization of *Nitrospira-Like* Nitrite-Oxidizing Bacteria active in wastewater treatment plants. *Applied and environmental microbiology*, 67, 5273-5284.
- Daly K., Sharp R., McCarthy A. (2000). Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria. *Microbiology*, 146, 1693-1705.
- Daphne. (1994). Hazardous organic waste amenable to biological treatment. *Biotechnology for the Treatment of Hazardous Waste.*, 1-26.
- Davenport R., Curtis T. (2008). Quantitative fluorescence in situ hybridisation (FISH): statical methods for valid cell counting. *Molecular Microbial Ecology Manual*, 7.07, 1487-1516.
- Devereux R., Kane M. D., Winfrey, J., Stahl D. A. (1992). Genus- and group-speciphic hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria. *Syst Appl Microbiol*, 15, 601-609.
- Dini F., Tozelli R., Falcão J., Marcon J., Labate A., Azevedo J., Araújo W. (2009). Culture-independent assessment of Rhizobiales-related *alphaproteobacteria* and the diversity of *Methylobacterium* in the Rhizosphere and Rhizoplane of transgenic Eucalyptus. *Microb Ecol*, 57, 82-93.
- Domsch K., Gams W., Anderson T-H. (1980). *Compendium of soil fungi*. London: Academic Press.

- Drake H., Küsel K., Matthies C. (2002). Ecological consequences of the phylogenetic and physiological diversities of acetogens. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 203-213.
- Edwards T., Calica N., Huang D., Manoharan N., Hou W., Huang L., Panosyan H., Dong H., Hedlund B. (2013). Cultivation and characterization of thermophilic *Nitrospira* species from geothermal springs in the US Great Basin, China, and Armenia. *FEMS Microbiology Ecology*, 1-10.
- Ehrich, S., D. Behrens, E. Lebedeva, W. Ludwig, and E. Bock. (1995). A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium. *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship. *Arch. Microbiol*, 164, 16-23.
- Eikelboom D.H., van Buijsan H.J.J. (1981). *Microscopic sludge investigation manual*. Delft, Netherlands: TNO Research Institute for Environmental Hygiene.
- Eller G., Stubner S., Frenzel P. (2001). Group-specific 16S rRNA targeted probes for the detection of type I and type II methanotrophs by fluorescence in situ hybridisation. *FEMS microbiology letters*, 198, 91-107.
- Emerson D., Rentz J., Lilburn T., Davis R., Aldrich H., Chan C., Moyer C. (2007). A novel lineage of *Proteobacteria* involved in formation of marine Fe-oxidizing microbial mat communities. *PloS One*, 2, 667.
- EPSAR. (s.f.). *EPSAR Entitat de Sanejament d'Aigües*. Obtenido de <http://www.epsar.gva.es/>
- Erguder T., Boon N., Wittebolle L., Marzorati M., Verstraete W. (2009). Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea. *FEMS microbiology reviews*, 33, 855-869.
- Estrada Vázquez C. Poggi Varaldo H.M., Macarie H., Kato M.T., Rodríguez Vázquez R., Esparza García F., García Mena J. (2001). Tolerance to oxygen exposure of anaerobic suspended biomass. *Proc. 9Th World Cong. Anaerobic Digestion- Anaerobic Conversion of sustainability., Part 2*, 575-579.
- Fauque, G. D. (1995). *Ecology of sulfate-reducing bacteria*. In *Sulfate-reducing Bacteria*. (L. L. Barton., Ed.) New York: Plenum.
- Fernández N., Sierra R., Field J., Amils R., Sanz J. (2008). Microbial Community dynamics in a chemolithotrophic denitrification reactor inoculated with methanogenic granular sludge. *ScienceDirect Chemosphere*, 70, 462-474.

- Fernández N., Sierra-Alvarez R., Field J.A., Amils R., Sanz J.L. (2008). Microbial community dynamics in a chemolithotrophic denitrification reactor inoculated with methanogenic granular sludge. *Chemosphere*, 70, 462-472.
- Fernández-Galiano D. (1976). Silver impregnation of ciliated protozoa: procedure yielding good results with the pyridinated silver carbonate methods. *Trans Am Micros Soc*, 95, 557-560.
- Fernández-Galiano D. (1994). The ammoniacal silver carbonate method as a general procedure in the study of protozoa of sewage (and other) waters. *Water Research*, 28, 495-496.
- Ferrer P. J., Seco A. (2007). *Tratamiento Biológico de aguas residuales*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Figuroa P. (26 de Marzo de 2006). *Pared celular, esporas y biosíntesis de macromoléculas*. (Escuela de medicina de la Universidad de Carolina del Sur. Instituto Politécnico Nacional-México) Recuperado el Mayo de 2011, de Microbiología e Inmunología On line: <http://pathmicro.med.sc.edu/spanish/chapter4.htm>
- Finster K., Liesack W., Thamdrup B. (1998). Elemental sulfur and thiosulfate disproportionation by *Desulfocapsa sulfoexigens sp.nov.*, a new anaerobic bacterium isolated from marine surface sediment. *Appl Environ Microbiol*, 64, 119-125.
- Foissner W., Blatterer H., Berger H., Kohmann F. (1991). *Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobien-systems, Band I: Cyrtophorida, Oligotrichida, Hypotrichida, Colpode*. München. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft.
- Foissner W., Berger H., Kohmann F. (1992). *Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobien-systems, Band II: Peritrichia, Heterotrichia, Odontostomatida*. München. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft.
- Foissner W., Berger H., Kohmann F. (1994). *Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobien-systems, Band III: Hymenostomata, Prostomatida, Nasulida*. München. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft.
- Foissner W., Blatterer H., Berger H., Kohmann F. (1995). *Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobien-systems, Band IV: Gymnostomatea, Loxodes, Suctoria*. München. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft.

- Foissner W., Berger H. (1996). A user-friendly guide to the ciliates (Protozoa, Ciliophora) commonly used by hydrobiologists as bioindicators in rivers, lakes, and waste waters, with notes on their ecology. *Freshwater. Biol.* 35: 375-482.
- Foti M., Sorokin D., Lomans B., Mussman M., Zacharova E., Pimenov N., Kuenen J., Muyzer G. (2007). Diversity, Activity, and abundance of Sulfate- Reducing Bacteria in saline and Hypersaline soda Lakes. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 2093-2100.
- Fournier M., Aubert C., Dermoun Z., Durand M.C, Moinier D., Dolla A. (2006). Response of the anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough to oxidative conditions: proteome and transcript analysis. *Biochimie*, 88, 85-94.
- Fuerst J. A. (2004). Planctomycetes-phyllum of emerging interest for microbial evolution and ecology. *WFCC*, 1-11.
- Fujitani H., Ushiki N. (2013). Isolation of sublineage I *Nitrospira* by a novel. *Environmental microbiology*, DOI: 10.1111/1462-2920.12248.
- Fukui M., Teske A., Assmus B., Muyzer G., Widdel F. (1999). Physiology phylogenetic relationships, and ecology of filamentous sulfate-reducing bacteria (genus *Desulfonema*). *Arch. Microbiol*, 172, 193–203.
- García J. L. (1991). Ecología de inóculos anaerobios específicos en el tratamiento de aguas residuales. *SIMPOSIO Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cefetera*, 2. Manizales, Colombia.
- García-Armisen T., Servais P. (2004). Enumeration of viable *E. coli* in rivers and wastewaters by fluorescent in situ hybridization. *J. Microbiol Methods*, 58, 269-279.
- Garg N., Getanjali. (2007). Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: process and signaling. A review. *Agron. Sustain Dev.*, 27, 59-68.
- Garrity G., Bell J., Lilburn T. (2004). *Taxonomic outline of the prokaryotes Bergey's manual of systematic bacteriology*.
- Garrity G., Brenner D J., Krieg N., Staley J. (2007). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* (Vols. Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria). Springer.
- Garrity G. M., Winters M., Searles D. B. (2001). *Taxonomic Outline of the Prokaryotic Genera Bergey's manual of systematic bacteriology*.
- Garrity G. M., Holt J. G. (2001). *Phylum BVIII. Nitrospirae phy. nov. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Archaea and the Deeply Branching*

- and Phototrophic Bacteria*. (R. W. D.R. Boone, Ed.) New York, NY: Springer-Verlag.
- GBS Grupo Bioindicación Sevilla. (2008). *Manual práctico para el estudio de grupos bioindicadores en fangos activos*. Sevilla: EMASESA metropolitán.
- Gebremariam S., Beutel M., Christian D., Hess T. (2011). Research advances and challenges in the microbiology of Enhanced Biological Phosphorus Removal-a critical review. *Water Environment Research*, 83, 195-219.
- Geona J., Garza Y., Rodríguez J., Martínez G. (2012). Análisis de la diversidad bacteriana por métodos moleculares no dependientes del cultivo microbiano. *CienciaAcierta*(29),
www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/CienciaCierta/CC29/1.html.
- Gich F., Garcia-Gil J., Overmann J. (2001). Previously unknown and phylogenetical diverse members of the green nonsulfur bacteria are indigenous to freshwater lakes. *Arch Microbiol*, 177, 1-10.
- Ginige M.P, Keller J., Blackall L.L. (2005). investigation of an acetate-fed denitrifying microbial community by stable isotope probing, full-cycle rRNA analysis, and fluorescent in situ hybridization-microautoradiography. *Appl. Environ Microbiol*, 71, 8683-8691.
- Ginige M.P., Hugenholtz P., Daims H., Wagner M., Keller J., Blackall L.L. (2004). Use of stable-isotope probing, full-cycle rRNA analysis, and Fluorescence in situ hybridization-microautoradiography to study a methanol-fed denitrifying microbial community. *Appl Environ Microbiol*, 70, 588-596.
- Gómez-Silván C., Molina-Muñoz M., Poyatos J.M., Ramos A. (2010). Structure of archaeal communities in membrane-bioreactor and submerged-biofilter wastewater treatment plants. *Bioresource Technology*, 101, 2096-2105.
- Graham D.W., Chaudhary J.A., Hanson R.S., Arnold R.G. (1993). Factors affecting competition between type I and type II methanotrophs in two-organism, continuous-flow reactors. *Microbial Ecology*, 25, 1-17.
- Gray N., Miskin I., Kornilova O., Curtis T., Head I. (2002). Occurrence and activity of Archaea in aerated activated sludge wastewater treatment plants. *Environmental microbiology*, 4, 158-168.
- Greenacre M. (2008). *La práctica del análisis de correspondencia*. España: Fundación BBVA.

- Griffin M.E., McMahon K.D., Mackie R.I., Raskin L. (1998). Methanogenic Population Dynamics during Start-Up of Anaerobic Digesters Treating Municipal Solid Waste and Biosolids. *John Wiley & Sons, Inc*, 342-355.
- Hair J. F., Anderson R. E., Tatham R. L., Black W. C. (1999). *Análisis Multivariante*. Madrid: Prentice Hall Iberia.
- Hallin S., Throbäck I.N., Dicksved J., Pell M. (2006). Metabolic profiles and genetic diversity of denitrifying communities in activated sludge after addition of methanol and ethanol. *Appl environ Microbiol*, 72, 5445-5452.
- Hanada S., Lui W., Shintani T., Kamagata Y., Nakamura K. (2002). *Tetrasphaera elongata* sp. nov., a polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52, 883-887.
- Hanson R., Hanson E. (1996). Methanotrophic Bacteria. *Microbiological reviews*, 439-471.
- Hao O.J., Chen J.M. Huang L., Buglass R.I. (1996). Sulfate reducing bacteria. *Reviews in Environmental Science and Technology*, 26, 155-187.
- Henckel T., Roslev P., Conrad R. (2000). Effects of O₂ and CH₄ on presence and activity of the indigenous methanotrophic community in rice field soil. *Environ Microbiol*, 2, 666-679.
- Hesselmann R., Werlen C., Hahn D., van der Meer J., Zehder A. (1999). Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge. *Syst Appl Microbiol*, 22, 454-465.
- Hidalgo M.D., García P.A. (2001). Influencia del sulfato en la degradación anerobia de materia orgánica. *Tratamiento de Aguas Residuales. Ingeniería Química*, 183-191.
- Holm N.G., Gliesche C.G., Hrisch P. (1996). Diversity and structure of *Hyphomicrobium* population in a sewage treatment plant and its adjacent receiving lake. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 522-528.
- Hovanec T.A., Taylor L.T., Blakis A., Delong E.F. (1998). *Nitrospira*-like bacteria associated with nitrite oxidation in freshwater aquaria. *Appl. Environ. Microbiol*, 64, 258-264.
- Hristova K.R., Mau M., Zheng D., Aminov R.I., Mackie R.I., Gaskins H.R., Raskin L. (2000). *Desulfotomaculum* genus- and subgenus-specific 16S rRNA hybridization probes for environmental studies. *Environ Microbiol*, 2, 143-159.

- Hu B., Qi R., Yang M. (2013). Systematic analysis of microfauna indicator values for treatment performance in a full-scale municipal wastewater treatment plant. *Journal of Environmental Sciences*, 25, 1379–1385.
- Hugenholtz P., Pitulle C., Hershberger K.L., Pace N.R. (1998a). Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *Journal Bacteriol*, 180, 366-376.
- Hugenholtz P., Goebel B.M., Pace N.R. (1998b). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal Bacteriol*, 180, 4765-4774.
- Hwang Kwanghyun, Shin Seung, Kim Jaai and Hwang Seokhwan. (2008). Methanogenic profiles by denaturing gradient gel electrophoresis using order-specific primers in anaerobic sludge digestion. *Applied microbiology and biotechnology*, 80, 269-276.
- Imachi H., Sekiguchi Y., Kamagata Y., Ohashi A., Harada H. (2000). Cultivation and in situ detection of a thermophilic bacterium capable of oxidizing propionate in syntropic association with hydrogenotrophic methanogens in a thermophilic methanogenic granular sludge. *Appl Environ Microbiol*, 66, 3608-3615.
- Imhoff J.F. (2006). The Phototrophic *Alpha-Proteobacteria*. The Phototrophic *Beta-Proteobacteria*. En F. S.-H. Dworkin M. (Ed.), *Prokaryotes* (Vol. 5). Minnesota, USA: Springer. University of Minnesota.
- Ito T., Nielsen J.L., Okabe S., Watanabe Y., Nielsen P.H. (2002). Phylogenetic Identification and Substrate Uptake Patterns of Sulfate-Reducing Bacteria Inhabiting an Oxidic-Anoxic Sewer Biofilm Determined by Combining Microautoradiography and Fluorescent In Situ Hybridization. *Applied And Environmental Microbiology*, 68, 356–364.
- Jackson B., McInerney M. (2000). Thiosulfate disproportionation by *Desulfotomaculum thermobenzoicum*. *Appl Environ Microbiol*, 66, 3650-3653.
- Jorgensen B.B. (1982). Mineralization of organic matter in the sea bed the role of sulphate reduction. *Nature*, 296, 643-645.
- Juretschko S., Loy A., Lehner A., Wagner M. (2002). The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. *System Appl Microbiol*, 25, 84-99.
- Juretschko S., Timmermann G., Schmid M., Schleifer K.-H., Pommering-Röser A., Koops H.-P., Wagner M. (1998). Combined molecular and conventional

- analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira-like* bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol*, 64, 3042-3051.
- Kaksonen A., Plumb J., Franzmann P., Puhakka J. (2004). Simple organic electron donors support diverse sulfate-reducing communities in fluidized-bed reactors treating acidic metal and containing wastewater. *Microbiology Ecology*, 47, 279-289.
- Kato M.T., Field J.A., Lettinga G. (1997). Anaerobe tolerance to oxygen and the potentials of anaerobic and aerobic cocultures for wastewater treatment. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 14, ISSN 0104-6632.
- Kawakoshi A., Nakazawa H., Fukada J., Sasagawa M., Katano Y., Nakamura S., Hosoyama A., Sasaki H., Ichikawa N., Hanada S., Kamagata Y., Nakamura K., Yamazaki S and Fujita N. (2012). Deciphering the genome of Polyphosphate Accumulating *Actinobacterium Microlunatus phosphorovus*. *DNA research* , 1-12.
- Kelly D. P., Wood A P. (2000). Confirmation of *Thiobacillus denitrificans* as a species of the genus *Thiobacillus*, in the Betha subclass of the *Proteobacteria*, with strain NCIMB 9548 as the type strain. *J of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 547-550.
- Kempf V.A., Trebesius K., Autenrieth I.B. (2000). Fluorescent in situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *J. Clin Microbiol*, 38, 830-838.
- Kerstens K., Vos P., Gillis M., Swings J., Vandamme P., Stackebrandt E. (2006). *Introduction to the Proteobacteria*.
- Khan S.T., Horiba Y., Yamamoto M., Hiraishi A. (2002). Members of the family Comamonadaceae as primary poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)-degrading denitrifiers in activated sludge as revealed by a polyphasic approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3206-3214.
- King J., Kostka J., Frischer M., Saunders F. (2000). Sulfate-reducing bacteria methylate mercury at variable rates in pure culture and marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 66, 2430-2437.
- Klenk H.P., Clayton R., Tomb J.F. and 48 other authors. (1997). The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature*, 390, 364-370.

- Kong Y., Beer M., Seviour R., Lindrea K., Rees G. (2001). Structure and functional analysis of the microbial community in an aerobic:anaerobic Sequencing Batch Reactor (SBR) with no phosphorus removal. *Syst Appl Microbiol*, 24, 597-609.
- Kong Y., Nielsen J., Nielsen P.H. (2004). Microautoradiographic study of Rhodocyclus-Related Polyphosphate-Accumulating Bacteria in full-scale Enhanced Biological Phosphorus Removal Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5383-5390.
- Kong Y., Nielsen J., Nielsen P.H. (2005). Identity and ecophysiology of uncultured Actinobacterial Polyphosphate Accumulating Organisms in full-scale Enhanced Biological Phosphorus Removal Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4076-4085.
- Kong Y., Ong S., Ng W., Liu W. (2002). Diversity and distribution of a deeply branched novel proteobacterial group found in anaerobic-aerobic activated sludge processes. *Environ Microbiol*, 4, 753-757.
- Kong Y., Xia Y., Nielsen J. L., Nielsen P. H. (2007). Structure and function of the microbial community in a full-scale enhanced biological phosphorus removal plant. *Microbiology*, 153, 4061-4073.
- Könneke M., Bernhard A., de la Torre J., Walker C., Waterbury J., Stahl D. (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 437, 543-546.
- Kragelund C., Kong Y., van der Waarde J., Thelen K., Eikelboom D., Tandoi V., Thomsen T.R., Nielsen P.H. (2006). Ecophysiology of different filamentous *Alphaproteobacteria* species from industrial waste water treatment plants. *Microbiology*, 152, 3003-3012.
- Kragelund C., Levantesi C., Borger A., Thelen K., Eikelboom D., Tandoi V., Kong Y., van der Waarde J., Krooneman J., Rosseti S., Rolighed T., Nielsen P.H. (2007). Identity, abundance and ecophysiology of filamentous *Chloroflexi* species present in activated sludge treatment plants. *FEMS microbiology ecology*, 59, 671-682.
- Krekeler D., Teske A., Cypionka H. (1998). Strategies of Sulfate-Reducing Bacteria to escape oxygen stress in a cyanobacterial mat. *FEMS Microbiology Ecology*, 25, 89-96.
- Krumholz L. R., Harris S. H., Tay S. T., Suflita J. M. (1999). Characterization of two subsurface H₂-utilizing bacteria, *Desulfomicrobium hypogaeium* sp. nov. and *Acetobacterium psammolithicum* sp. nov., and their ecological roles. *Appl. Environ. Microbiol*, 65, 2300-2306.

- Kuenen G., Jetten M. (2001). Extraordinary anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *ASM News*, 67, 456-463.
- Kwon H.K., Yoon J.H., Kim S.H., Hong S.B., Cheon Y., Ko S.J. (2007). Detection of extracellular enzyme activities in various *Fusarium spp.* *Mycobiology*, 35, 162-165.
- Labbé N., Laurin V., Juteau P., Parent S., Villemur R. (2007). Microbiological Community Structure of the Biofilm of a Methanol-Fed, Marine Denitrification System, and Identification of the Methanol-Utilizing Microorganisms. *Microbial Ecology*. 1-17
- Labrenz M., Sintés E., Toetzke F., Zumsteg A., Herndl G.J., Seidler M., Jürgens K. (2010). Relevance of a crenarchaeotal subcluster related to *Candidatus Nitrosopumilus maritimus* to ammonia oxidation in the suboxic zone of the central Baltic Sea. *The ISME Journal*, 4, 1496-1508.
- LaParra T., Nakatsu C., Pantea L., Alleman J. (2000). Phylogenetic analysis of bacterial communities in mesophilic and thermophilic bioreactors treating pharmaceutical wastewater. *Appl. and environmental microbiology*, 66, 3951-3959.
- Leclerc M., Delgènes J., Godon J. (2004). Diversity of the archaeal community in 44 anaerobic digesters as determined by single strand conformation polymorphism analysis and 16S rDNA sequencing. *Environmental microbiology*, 6, 809-819.
- Lee H., Yong W., Park K., Choi E., Lee J.W. (2008). Bacterial community and biological nitrate removal: comparisons of Autotrophic and Heterotrophic reactors for denitrification with Raw Sewage. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 18, 1826-1835.
- Leslie J., Summerell B. (2006). *The Fusarium Laboratory manual*. Blackwell Publishing.
- Leung K.H., S. P. (2008). Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis. En R. R. Walker John M., *Molecular Biomethods Handbook*. (págs. 117-131). Humana Press.
- Levantesi C., Serafim L., Crocetti G., Lemos P., Rossetti S., Blackall L., Reis M., Tandoi V. (2002). Analysis of the microbial community structure and function of a laboratory scale Enhanced Biological Phosphorus Removal reactor. *Environ Microbiol*, 4, 559-569.
- Lie T., Godchaux W., Leadbetter R. (1999). Sulfonates as terminal electron acceptors for growth of Sulfate-Reducing bacteria (*Desulfobacterium spp.*) and Sulfate-

- Reducing bacteria: Effects of inhibitors of sulfidogenesis. *Appl Environ Microbiol*, 65, 4611-4617.
- Liesack W., Dunfield P.F. (2002). Biodiversity in soils: use of molecular methods for its characterization. En B. G. (Ed.), *Encyclopedia of Environmental Microbiology* (págs. 528-544). New York: Wiley & Sons Inc.
- Lin X., Wakeham S., Putnam I., Astor Y., Scranton M., Chistoserdov A., Taylor G. (2006). Comparison of Vertical Distributions of Prokaryotic Assemblages in the Anoxic Cariaco Basin and Black Sea by Use of Fluorescence In Situ Hybridization. *Appl Environ Microbiol*, 72, 2679–2690.
- Liu W., Hanada S., Marsh T., Kamagata Y., Nakamura K. (2002). *Kineospira limosa* gen. Nov., sp nov., a novel Gram positive polyhydroxyalkanoate accumulating coccus isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52, 1845-1849.
- Liu W., Mino T., Nakamura K., Matsuo T. (1996). Glycogen accumulating population and its anaerobic substrate uptake in anaerobic-aerobic activated sludge without biological phosphorus removal. *Water Research*, 30, 75-82.
- Liu W-T., Chan O-C., Fang H. (2002). Characterization of microbial community in granular sludge treating brewery wastewater. *Water Research*, 36, 1767-1775.
- Liu W-T., Marsh T., Cheng H., Forney L. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 63, 4516-4522.
- Liu W-T., Nielsen A., Wu J-H., Tsai C-S., Matsuo Y., Molin S. (2001). In situ identification of polyphosphate- and polyhydroxyalkanoate-accumulating traits for microbial populations in a biological phosphorus removal process. *Environmental Microbiology*, 3, 110-122.
- Londry K., Fedorak M., Sufilita J.M. (1997). Anaerobic degradation of m-cresol by a sulfate reducing bacterium. *Appl Environ Microbiol*, 63, 3170-3175.
- Loubinoux J., Bronowicki P., Pereira C., Mougénel L., Faou E. (2002). Sulfate-reducing bacteria in human faces and their association with inflammatory bowel diseases. *FEMS Microbiol Ecology*, 40, 107-112.
- Lovley D.R., Phillips E.J. (1992). Reduction of uranium by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Appl. Environ. Microbiol*, 58, 850–856.
- Loy A., Lehner A., Lee N., Adamczyk J., Meier H., Ernt J., Scheifer K-H., Wagner M. (2002). Oligonucleotide Microarray for 16S rRNA Gene-Based Detection of

- All Recognized Lineages of Sulfate-Reducing Prokaryotes in the Environment. *Appl Environ Microbiol*, 68, 5064-5081.
- Loy A., Maixner F., Wagner M., Horn M. (2007). probeBase-an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new feature 2007. *Nucleic Acid Research*, 35, Published on line doi:10.1093/nar/gkl856.
- Lücker S., Steger D., Kjeldsen K. U., MacGregor B. J., Wagner M., Loy A. (2007). Improved 16S rRNA-targeted probe set for analysis of sulfate-reducing bacteria by fluorescence in situ hybridization. *Journal of Microbiological Methods*, 69, 523-528.
- Lücker S., Wagner M., Maixner F., Pelletier E., Koch H., Vacherie B., Rattel T., Sinninghe J., Spieck E., Le Paslier D., Daims H. (2010). A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. *PNAS*, 1-6.
- Ludwig, W., Bauer S.H., Bauer M., Held I., Kirchhof G., Schulze R. et al., (1997). Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. *FEMS Microbiol Lett*, 153, 181-190.
- Madigan M., Martinko T., Parker J.M., Jack. (2004). *Brock.Biología de los Microorganismos. Décima Edición*. Madrid: Pearson Educación, S.A.
- Madigan M., Martinko T., Parker J.M. (1997). *Brock Biology of the microorganims*. Prentice-Hall.
- Madoni P. (1994). A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated-sludge plants based on the microfauna analysis. *Water Res.* 28: 67-75.
- Maixner F., Wagner M., Lücker S., Pelletier E., Schmitz-Esser S., Hace K., Spieck E., Konrat R., LA Paslier D., Daims H. (2008). Environmental genomics reveals a functional chlorite dismutase in the nitrite-oxidizing bacterium "*Candidatus Nitrospira defluvii*". *Environmental Microbiology*, 10, 3043-3056.
- Maixner M.F. (2009). The ecophysiology of nitrite-oxidizing bacteria in the genus *Nitrospira*: Novel aspects and unique features. *Doctoral Thesis*. Wien: Universität Wien.
- Manz W., Amann R., Ludwig W., Vancanneyt M., Schleifer K-H. (1996). Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* in the natural environment. *Microbiology*, 142, 1097-1106.

- Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M., Scheifer K-H. (1992). Phylogenetic oligonucleotide probes for the major subclasses of *Proteobacteria*: problems and solutions. *Syst Appl Microbiol*, 15, 593-600.
- Marco A.E. (1997). How and why combine chemical biological processes for wastewater treatment. . *Water Science and Technology*, 35, 321-327.
- Martens-Habbena W., Berube P.M., Urakawa H, de la Torre J.R., Stahl D.A. (2009). Ammonia oxidation kinetics determines niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. *Nature*, 461, 976-981.
- Maszenan A., Seviour R., Patel B., Rees G., McDougall B. (1997). *Amaricoccus gen. nov.*, a gram-negative coccus occurring in regular packages or tetrads, isolated from activated sludge biomass, and descriptions of *Amaricoccus veronensis sp. nov.*, and *Amaricoccus kaplicensis sp. nov.* *Int J Syst Bacteriol.*, 47, 727-734.
- Mc Kee T. Mc Kee J. R. (2003). *la base molecular de la vida.* (3 ed.). Mc Graw Hill. Interamerica.
- McLellan S., Huse S., Mueller-Spitz S., Andreishcheva E., Sogin M. (2010). Diversity and population structure of sewage-derived microorganisms in wastewater treatment plant influent. *Environmental microbiology*, 12, 378-392.
- Meier H., Amann R., Ludwig W., Schleifer K.-H. (1999). Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of Gram-positive Bacteria with low DNA G+C content. *Syst. Appl. Microbiol*, 22, 186-196.
- Meisinger D., Zimmermann J., Ludwig W., Schleifer K-H., Wanner G., Schmidl Michael., Bennett P., Engel A., Natuschka M. (2007). In situ detection of novel *Acidobacteria* in microbial mats from a chemolithoautotrophically based cave ecosystem (Lower Kane Cave, WY, USA). *Environmental Microbiology*, 9, 1523-1534.
- Meyer R., Saunders A., Blackall L. (2006). Putative glycogen-accumulating organisms belonging to *alphaproteobacteria* identified through rRNA-based stable isotope probing. *Microbiology*, 152, 419-429.
- Mino T., Lui W., Kurisu F., Matsuo T. (1995). Modelling glycogen storage and denitrification capability of microorganisms in Enhanced Biological Phosphate Removal processes. *Water Science Technology*, 31, 25-34.
- Miura Y., Watanabe Y., Okabe S. (2007). Significance of *Cloroflexi* in performance of Submerged membrane bioreactors (MBR) treating municipal wastewater. *Environmental science and technology*, 41, 7787-7794.

- Modin O., Fukushi K., Yamamoto K. (2007). Denitrification with methane as external carbon source. *Water research*, 41, 2726-2738.
- Molinero, L. M. (Julio de 2003). *Asociación de la Sociedad Española de Hipertensión*. Obtenido de www.seh-lelha.org/statl.htm
- Morenilla J.J., Bernácer I., Lloret R.M., Alonso J.L., Cuesta G., Ramírez G. (2009). *Manual de técnicas avanzadas para la identificación y control de bacterias filamentosas*. Valencia: EPSAR-Generalitat Valenciana.
- Moreno Y., Ferrús M.A. (2012). Specific detection of cultivable *Helicobacter pylori* cells from wastewater treatment plants. *World Biomedical Frontiers*, 17, 327-332.
- Morgan F., Nielsen J., Nielsen P.H. (2008). Substrate-dependent denitrification of abundant probe-defined denitrifying bacteria in activated sludge. *FEMS Microbiol Ecol*, 66, 447-461.
- Mujeriego. (1990). *Riego con agua residual municipal regenerada*. Barcelona: Diputación de Barcelona.
- Murrell J. (1994). Molecular genetics of methane oxidation. *Biodegradation*, 5, 145-149.
- Muyzer G., de Waal E., Uitterlinden A. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 59, 695-700.
- Muyzer G., Stams A. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *nature reviews microbiology*, 6, 441-454.
- Neef A. (1997). An wendug der in situ-Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur populations analyse in Komplexen Mikrobiellen biozönsen. *Doctoral Thesis*. Faculty of Biology, Chemistry and Geosciences, Technische Universita't München.
- Neef A., Amann R., Schlesner H., Schleifer K-H. (1998). Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of *Planctomycetes* with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology*, 144, 3257-3266.
- Neef A., Witzemberger R., Kämpfer P. (1999). Detection of *Sphingomonadales* and in situ identification in activated sludge using 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23, 261-267.

- Neef A., Zaglauer A., Meier H., Amann R., Lemmer H., Scheifer K-H. (1996). Population analysis in a denitrifying sand filter: conventional and in situ identification of *Paracoccus spp.* in methanol-fed biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 62, 4329-4339.
- Nelson P., Toussoun T., Marasas W. (1983). *Fusarium species. An illustrated manual for identification*. London: Pennsylvania State University Press.
- Nguyen H., Nielsen J., Nielsen P.H. (2012). *Candidatus Halomonas phosphatis*, a novel polyphosphate-accumulating organism in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. *Environmental Microbiology*, 14, 2826-2837.
- Nielsen A., Liu W., Filipe C., Grady L., Molin S., Stahl D. (1999). Identification of a novel group of bacteria in activated sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor. *Appl Environ Microbiol*, 65, 1251-1258.
- Nielsen P.H., Mielczarek A. T., Kragelund C., Nielsen J. L., Saunders A. M., Kong Y., Hansen A.A., Vollertsen J. (2010). A conceptual ecosystem model of microbial communities in enhanced biological phosphorus removal plants. *Water Research*, 44, 5070-5088.
- Nielsen P.H., Saunders A., Hansen A., Larsen P., Nielsen J. (2012). Microbial communities involved in enhanced biological phosphorus removal from wastewater- a model system in environmental biotechnology. *Biotechnology*, 23, 454-459.
- Nielsen P.H., Daims H., Lemmer H. (2009). *FISH Handbook for Biological wastewater treatment*. London. IWA Publishing.
- Nwanma B., Onyike N., Nelson P. (1993). The distribution of *Fusarium* species in soil planted to millet and sorghum in Lesotho, Nigeria and Zimbabwe. *Mycopathologia*, 121, 105-114.
- Oehmen A., Yuan Z., Blackall L., Keller J. (2004). Short-term effects of carbon source on the competition of polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Water Science Technology*, 40, 139-144.
- Oehmen A., Yuan Z., Blackall L., Keller J. (2005). Comparison of acetate and propionate uptake by polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 91, 162-168.
- Oehmen A., Yuan Z., Blackall L., Keller J. (2005). Comparison of Acetate and Propionate Uptake by Polyphosphate Accumulating Organisms and Glycogen Accumulating Organisms. *Wiley Periodicals, Inc.*

- Okabe S., Satoh H., Watanabe Y. (1999). In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 3182-3191.
- Osaka T., Yoshie S., Tsuneda S., Hirata A., Iwami N., Inamori Y. (2006). Identification of acetate-or methanol-assimilating bacteria under nitrate-reducing conditions by stable-isotope probing. *Microb Ecol*, 52, 253-266.
- Pallud C., Van Cappellen P. (2006). Kinetics of microbial sulfate reduction in estuarine sediments. *Geochimica*, 70, 1148-1162.
- Parés R.; Juárez A. (1997). *Bioquímica de los microorganismos*. Reverté, S.A.
- Park H.D., Wells G.F., Bae H., Criddle C.S., Francis C.A. (2006). Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactor. *Appl. Environ Microbiol*, 72, 5643-5647.
- Park H.D., Noguera D.R. (2008). *Nitrospira* community composition in nitrifying reactors operated with two different dissolved oxygen levels. *J Microbiol Biotechnol*, 18, 1470-1474.
- Postgate J.R. (1984). *The Sulphate Reducing Bacteria*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Rabus R., Fukui M., Wilkes H., Widdel F. (1996). Degradative capacities and 16S rRNA-targeted whole cell hybridization of sulfate-reducing bacteria in an anaerobic environment culture utilizing alkylbenzenes from crude oil. *Appl. Environ. Microbiol*, 62, 3605–3613.
- Rabus R., Wilkes H., Schramm A., Harms G., Behrends A., Amann R., Widdel F. (1999). Anaerobic utilization of alkylbenzenes and n-alkanes from crude oil in an enrichment culture of denitrifying bacteria affiliating with the beta-subclass of *Proteobacteria*. *Environ Microbiol*, 1, 145-157.
- Ramírez Florina. (1992). *Degradación Anaerobio de acetamina*. Tesina de Máster. México, Distrito Federal: Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
- Ramsing N. B., Fossing H., Ferdelman T. G., Andersen F., Thamdrup B. (1996). Distribution of bacterial populations in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) quantified by in situ hybridization and related to chemical gradients in the water column. *Appl Environ Microbiol*, 62, 1391-1404.
- Raskin L., Stromley J., Rittmann B., Stahl D. (1994). Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Applied and environmental microbiology*, 60, 1232-1240.

- Rodríguez E., Isac L., Salas L., Fernandez N., Zornoza A., Perez B., Serrano S., Arregui L., Calvo P., Guinea A., Estevez F. (2008). *Manual práctico para el estudio de grupos bioindicadores en fangos activos*. Ed. Tecnología del Agua y EMASESA
- Rojas N. (1995). El lipopolisacárido bacteriano: una potente endotoxina con múltiples actividades biológicas, recientes avances en estructura, genética y bioquímica / Lipopolysaccharides, bacterial: an potent endotoxin with multiples biological activities. *Rev. costarric. cienc. méd*, 16, 71-84.
- Roller C., Wagner M., Amann R., Ludwig W., Schleifer K.-H. (1994). In situ probing of gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology*, 140, 2849-2858.
- Romero R., Zúñiga L. R. (1993). *Estadística. Diseño de experimentos modelos de regresión*. Valencia. Universidad Politécnica de Valencia.
- Ruel S.M., Comeau Y., Ginestet P., Héduit A. (2002). Modeling Acidogenic and Sulfate-Reducing processes for the determination of fermentable fractions in wastewater. *Biotechnol Bioeng*, 80, 525-536.
- Sait M., Hugenholtz P., Janssen P.J. (2002). Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation independent surveys. *Environ Microbiol*, 4, 654-666.
- Salazar K. (2008). Estructura poblacional de bacterias sulfato reductoras y arqueas metanógenicas en perfiles sedimentarios de lagunas de aguas blancas y negras de la cuenca amazónica del río Bani. La Paz, Bolivia: *Tesis de Maestría*. Universidad Mayor de San Andrés.
- Sanapareddy N., Hamp T., Gonzalez L., Hilger H., Fodor A., Clinton S. (2009). Molecular diversity of a North Carolina wastewater treatment plant as revealed by pyrosequencing. *Applied and environmental microbiology*, 75, 1688-1696.
- Santegoeds C.M., Ferdelman T.G., Muyzer G., Beer D. (1998). Structural and functional dynamics of sulfate-reducing populations in bacterial biofilms. *Appl. Environ Microbiol*, 64, 3731-3739.
- Schimid M., Walsh K., Webb R., Rijpstra W.I.C., Van de Pas-Schoonen K., Verbruggen M., Hill T., Moffett B., Fuerst J., Schouten S., Sinninghe Damste J.S., Harris J., Shaw P., Jetten M., Strous M. (2003). *Candidatus Scalindua brodae*, sp. nov., *Candidatus Scalindua wagnei*, sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 26, 529-538.

- Schmid M., Twachtmann U., Klein M., Strous M., Juretschko S., Jetten M., Metzger J.W., Schleifer K.H., Wagner M. (2000). Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Syst Appl Microbiol*, 23, 93-106.
- Schmid M., Walsh K., Webb R., Rijpstra W.I.C., Van de Pas-Schoonen K., Verbruggen M., Hill T., Moffett B., Fuerst J., Schouten J., (Abril de 2005). Biomarkers for In Situ Detection of Anaerobic Ammonium-Oxidizing (Anammox) Bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 71, 1677-1684.
- Schoenborn L., Abdollahi H., Tee W., Dyal-Smith M., Janssen P. (2001). A Member of the Delta Subgroup of *Proteobacteria* from a Pyogenic Liver Abscess Is a Typical Sulfate Reducer of the Genus *Desulfovibrio*. *Journal of clinical Microbiology*, 39, 787-790.
- Schramm, A., Beer D., Wagner M., Amann R. (1998). Identification and activities in situ of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. *Appl. Environ. Microbiol*, 64, 3480-3485.
- Schroeder S., Ahn J., Servioir R.J. (2008). Ecophysiology of polyphosphate-accumulating organisms and glycogen-accumulating organisms in a continuously aerated enhanced biological phosphorus removal process. *J. Appl Microbiol*, 105, 1412-1420.
- Schule R., Spring S., Amann R., Huber I., Ludwig W., Schleifer K-H., Kämpfer P. (1999). Genotypic diversity of *Acidovorax* strains isolated from activated sludge and description of *Acidovorax defluvii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 22, 205-214.
- Schwieger F., Tebbe C.C. (1998). A new approach to utilize PCR-single strand conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl. Environ Microbiol*, 64, 4870-4876.
- Scott K.M., Sievert S.M., Abril F.N., Ball L.A., Barrett C.J., Blake R.A., Boller A.J., and 36 others authors. (2006). The genome of deep-sea vent chemolithoautotroph *Thiomicrospira crunogena* XCL-2. *PLoS Biol.*(4), 383.
- Scott R.J., Ollis D.F. (1995). Integration of chemical and biological oxidation processes for water treatment: review and recommendation. *Environmental Prog.*, 14, 88-103.
- Serrano S., Arregui L., Pérez-Uz B., Calvo P., Guinea A., 2008. *Guidelines for the Identification of Ciliates in Wastewater Treatment Plants*. IWA Publishing, London.

- Serviou R., Nielsen P.H. (2010). *Microbial Ecology of Activated sludge*. IWA Publishing.
- Shen P., Zhang J., Zhang J, Jiang C., Tang X., Li J., Zhang M., Wu B. (2013). Changes in microbial community structure in two anaerobic systems to treat bagasse spraying wastewater with and without addition of molasses alcohol wastewater. *Bioresource Technology*, 131, 333-340.
- Shen Z., Zhou Y., Wang J. (2013). Comparison of denitrification performance and microbial diversity using starch/polylactic acid blends and ethanol as electron donor for nitrate removal. *Bioresource Technology*, 131, 33-39.
- Shintani T., Liu W., Hanada S., Kamagata Y., Miyaoka S., Suzuki T., Nakamura K. (2000). *Micropruina glycogenica* gen. nov., sp. nov., a new Gram positive Glycogen-Accumulating Bacterium isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol*, 1, 201-207.
- Siegal S. (1983). *Estadística no paramétrica*. México: Trillas.
- Signorile G., Molinari A., Lugoli F., Sciancalepore L., Montemurro P., Donno A. (2010). Study of the correlation between microfauna and the macrostructure of activated sludge and the efficiency of biological wastewater treatment plants. *J Prev Med Hyg*, 51, 15-19.
- Sikora A., Błaszczuk M., Jurkowski M., Zielenkiewicz U. (2013). Lactic Acid Bacteria in Hydrogen-Producing Consortia: On Purpose or by Coincidence?. *Lactic Acid Bacteria-R&D for food, Health and Livestock Purposes* INTECH.
- Simon N., Le Bor N., Partensky D.M.F., Vaultot D. (1995). Fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes to identify small phytoplankton by flow cytometry. *Appl Environ Microbiol*, 61, 2506-2513.
- Singleton R. Jr. (1993). The sulfate-reducing bacteria: an overview. En S. R. Odom J. M. (Ed.), *The sulfate-reducing bacteria: contemporary perspectives*. New York, N.Y.: Springer-Verlag.
- Smith R., Doucette-Stamm L., Deloughery C., et al. (1997). Complete genome sequence of *Methanobacterium Thermoautotrophicum*: functional analysis and comparative genomics. *J. Bacteriology*, 179, 7135-7155.
- Sorensen J., Christensen D., Jorgensen B. (1981). Volatile fatty acids and hydrogen as substrates for sulfate reducing bacteria in anaerobic marine sediment. *Appl. Environ Microbiol*, 42, 5-11.

- Spieck E., Hartwig C., McCormack I., Maixner F., Wagner M., Lipski A., Daims H. (2006). Selective enrichment and molecular characterization of a previously uncultured Nitrospira-like bacterium from activated sludge. *Environ Microbiol*, 8, 405-415.
- Spring S., Jäckel U., Wagner M., Kämpfer P. (2004). *Ottowia thiooxydans* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic, N₂O-producing bacterium isolated from activated sludge, and transfer of *Aquaspirillum gracile* to *Hylemonella gracilis* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 99-106.
- Stackebrandt E., Murray G.E., Trüper H.G. (1988). Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "Purple Bacteria and Their Relatives". *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38, 321-325.
- Stahl D.A., Amann R. (1991). Development and application of nucleic acid probes. En G. M. Stackebrandt E. (Ed.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic* (págs. 205–248). Chichester, UK: John Wiley & Sons.
- Steffen C., Ankenbauer W., Bauer-Hofmann R., Bye S., Eisel D., Frey B., Keesey J., Rosenstraus M., Schäferkordt S., Schlicht H-J. (1999). PCR Applications Manual. *Roche Molecular Biochemicals*. Germany. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim.
- Steger J., Ballard C.C., Krumholz L. (2002). *Desulfovibrio* sp. Genes involved in the respiration of sulfate during metabolism of hydrogen and lactate. *App. Environ Microbiol*, 68, 1932-1937.
- Stres B. (2006). The first decade of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) in microbial ecology. *Acta agriculturae Slovenica*, 88, 65-73.
- Strous M., Fuerst J., Kramer E., Logemann S., Muyzer G., Van de Pas-Schooen K., Webb R., Kuenen J., Jetten M. (1999). Missing lithotroph identified as new *Planctomycete*. *Nature*, 400, 446-449.
- Teira M.R. (1996). Bases microbiológicas, microorganismos nitrificantes, desnitrificantes y con capacidad de acumular fósforo. *2n Curs d'Enginyeria Ambiental. Eliminació de nutrients en aigües residuals.*, (págs. 28-30). Leida.
- Thomsen T.R., Kong Y., Nielsen P.H. (2007). Ecophysiology of dominant denitrifying bacteria in activated sludge. *FEMS Microbiol Ecol.*, 60, 370-382.

- Thurnheer T., Gmür R., Guggenheim B. (2004). Multiplex FISH analysis of a six-species bacterial biofilm. *J. Microbiological Methods*, 56, 37-47.
- Torres-Alvarado M.R., Fernández F.J., Ramírez F., Varona-Cordero F. (2013). Dynamics of the Methanogenic Archaea in Tropical Estuarine Sediments. *Hindawi Publishing Corporation Archaea*, 1-13.
- Tortosa Gerard J., Funke Berdell R. and Case Christine L. (2007). *Introducción a la microbiología. 9ª ed.* Buenos Aires: Médica Panamericana .
- Trebesius K., Leitritz L., Adler K., Schubert S., Autenrieth I.B., Heesemann J. (2000). Clture independent and rapid identification of bacterial pathogens in necrotising fasciitis and streptococcal toxic shock syndrome by fluorescence in situ hybridization. *Med. Microbiol Immunol*, 188, 169-175.
- Tsien H.C., Brattina B.J., Tsuji K., Hanson R.S. (1990). Use of oligonucleotide signature probes for identification of physiological groups of methylotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol*, 56, 2858-2865.
- Vilaseca M. (2001). Boletín Intexter (U.P.C.). *Observación microscópica de fangos activados en los tratamientos de depuración biológica*, 67-72. Cataluña, España.
- Voordouw G. (1995). The genus *Desulfovibrio*: the centennial. *App Environ Microbiol*, 61, 2813-1819.
- Wagner M., Loy A. (2002). Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Environmental biotechnology*, 218-227.
- Wagner M., Rath G., Koops H.-P., Flood J., Amann R. (1996). In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Water Sci. Technol*, 34, 237-244.
- Wagner M., Erhart R., Manz W., Amann R., Lemmer H., Wedi D., Schleifer K.-H. (1994). Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol*, 60, 792-800.
- Wang X., Wen X., Criddle C., Yan H., Ding K. (2010). Bacterial community dynamics in two full-scale wastewater treatment systems with functional stability. *Journal of applied microbiology*, 109, 1218-1226.

- Wanner J. (1994). *Activated Sludge Bulking and Foaming Control*. Technomic Publishing Co. Inc. Lancaster.
- Ward B.B., Eveillard D., Krishtein J.D., Nelson J.D., Voytek M.A., Jackson G.A. (2007). Ammonia-oxidizing bacterial community composition in estuarine and oceanic environments assessed using a functional gene microarray. *Environmental Microbiology*, 9, 2522–2538.
- Watson S.W., Bock E., Valois F.W., Waterbury J.B., Schlosser U. (1986). *Nitrospira marina* gen. nov. sp. nov.: a chemolithotrophic nitrite oxidizing bacterium. *Arch. Microbiol*, 144, 1-7.
- Whittaker R.H. (1969). New concepts of kingdoms of organisms. *Science* 163, 150-160.
- Widdel F. (1988). *Microbiology and ecology of sulfate-and sulfur-reducing bacteria*. (Z. A. B, Ed.) New York, N.Y.: John Wiley & Sons, Inc.
- Widdel F., Bak F. (1992). Gram-negative mesophilic sulfate-reducing. En T. H. Balows A. (Ed.), *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications* (págs. 3352–3378). New York, N.Y: Springer-Verlag.
- Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L. (1990). Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl.Acad. Sci., USA* 87(12), 4576-4579.
- Woese C.R., Fox G.E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 5088-5090.
- Wong M., Tan F., Ng W., Liu W. (2002). Identification and occurrence of Tetrad-Forming Organisms in deteriorated biological phosphorus removal systems. *Water science Technology*, 150, 3741-3748.
- Wong M., Tan F., Ng W., Liu W. (2004). Identification and occurrence of tetrad-forming *Alphaproteobacteria* in anaerobic-aerobic activated sludge processes. *Microbiology*, 150, 3741-3748.
- Ye L., Zhang T. (2013). Bacterial communities in different sections of a municipal wastewater treatment plant revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97, 2681-2690.

- Yoon D-N., Park S-J., Kim S.J., Jeon C, Chae J-C., Reen K. (2010). Isolation, Characterization, and abundance of filamentous members of *Caldilineae* in Activated Sludge. *The Microbiological society of Korea.*, 48, 275-283.
- Yu K., Zhang T. (2012). Metagenomic and Metatranscriptomic Analysis of Microbial community Structure and Gene expression of Activated sludge. *PLoS one*, 7, on line e38183.
- Yu T., Li D., Qi R., Li S-t., Xu S-W., Yang M. (2011). Structure and dynamics of nitrifier populations in a full-scale submerged membrane bioreactor during start-up. *Appl Microbiol Biotechnol*, 90, 369-376.
- Yuan Z., Blackall L. (2002). Sludge population optimisation: a new dimension for the control of biological wastewater treatment systems. *Water Research*, 36, 482-490.
- Zhang H., Xu Y., Ding Y., Yang Q., Ren S., Li X., Chen, X., Xu Y., Hao H. (2012). Molecular diversity analysis of *Planctomycete-like* bacteria in inosine fermentation and municipal wastewater treatment systems. *African Journal of Microbiology Research*, 6, 6635-6641.
- Zhang T., Smothers K. (2004). *Development of sulfur-limestone autotrophic denitrification processes for treatment of in small communities*. Midwest Technology Assistance Center (MTAC).
- Zhang T., Shao F.M., Ye L. (2012). 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *International Society for Microbial Ecology*, 6, 1137-1147.
- Zhao Y., Ren N., Wong A. (2008). Contributions of fermentative acidogenic bacteria and sulfate-reducing bacteria to lactate degradation and sulfate reduction. *Chemosphere*, 72, 233-242.
- Zilles J., Peccia J., Kim M-W., Hung C-H., Noguera D. (2002). Involvement of Rhodocyclus-Related organisms in Phosphorus removal in full-scale wastewater treatment plants. *Appl Environ Microbiol*, 68, 2763-2769.
- Zimmermann J., Gonzalez J., Ludwig W., Saiz-Jimenez C. (2005). Detection and phylogenetic relationships of highly diverse uncultured acidobacterial communities in Altamira Cave using 23 S rRNA sequence analyses. *Geomicrobiol J*, 22, 379-388.
- Zinkevich V., Beech I. (2000). Screening of sulfate-reducing bacteria in colonoscopy samples from healthy and colitic human gut mucosa. *FEMS Microbiology Ecology*, 34, 147-155.

Anexos

Anexo 1. Estadísticos de la prueba de intensidad de señal

One Way Analysis of Variance

Data source: *Actinobacteria*

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0.518)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.248)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
10 min	20	0	147.200	30.162	6.744
15 min	20	0	162.500	18.911	4.229
20 min	20	0	185.150	20.423	4.567
30 min	20	0	145.500	23.871	5.338
40 min	20	0	127.050	31.312	7.002

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	37720.260	9430.065	14.576	<0.001
Residual	95	61460.700	646.955		
Total	99	99180.960			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001).

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Fisher LSD Method):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	LSD(alpha=0.050)	P	Diff >= LSD
20 min vs. 40 min	58.100	15.968	<0.001	Yes
20 min vs. 30 min	39.650	15.968	<0.001	Yes
20 min vs. 10 min	37.950	15.968	<0.001	Yes
20 min vs. 15 min	22.650	15.968	0.006	Yes
15 min vs. 40 min	35.450	15.968	<0.001	Yes
15 min vs. 30 min	17.000	15.968	0.037	Yes
15 min vs. 10 min	15.300	15.968	0.060	No
10 min vs. 40 min	20.150	15.968	0.014	Yes
10 min vs. 30 min	1.700	15.968	0.833	No

30 min vs. 40 min 18.450 15.968 0.024 Yes

One Way Analysis of Variance

Data source: *Nitrosopumilus maritimus*

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0.076)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.059)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
10 min Gpos	20	0	156.050	14.088	3.150
10 min Gneg	20	0	129.100	16.695	3.733
15 min Gpos	20	0	137.450	14.781	3.305
15 min Gneg	20	0	154.250	25.005	5.591
20 min Gpos	20	0	133.600	17.425	3.896
20 min Gneg	20	0	126.200	14.717	3.291
30 min Gpos	20	0	132.300	11.108	2.484
30 min Gneg	20	0	133.800	24.202	5.412
40 min Gpos	20	0	142.950	17.872	3.996
40 min Gneg	20	0	111.600	12.407	2.774
Sin Lisozima Gneg	20	0	140.900	20.113	4.497

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	10	31446.800	3144.680	10.090	<0.001
Residual	209	65134.400	311.648		
Total	219	96581.200			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001).

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Fisher LSD Method):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	LSD(alpha=0.050)	P	Diff >= LSD
10 min Gpos vs. 40 min Gneg	44.450	11.005	<0.001	Yes
10 min Gpos vs. 20 min Gneg	29.850	11.005	<0.001	Yes
10 min Gpos vs. 10 min Gneg	26.950	11.005	<0.001	Yes

Estudio de las poblaciones bacterianas y su relación con los parámetros físico químicos del tratamiento de Aguas residuales

10 min Gpos vs. 30 min Gpos	23.750	11.005	<0.001	Yes
10 min Gpos vs. 20 min Gpos	22.450	11.005	<0.001	Yes
10 min Gpos vs. 30 min Gneg	22.250	11.005	<0.001	Yes
10 min Gpos vs. 15 min Gpos	18.600	11.005	0.001	Yes
10 min Gpos vs. Sin Lisozima	15.150	11.005	0.007	Yes
10 min Gpos vs. 40 min Gpos	13.100	11.005	0.020	Yes
10 min Gpos vs. 15 min Gneg	1.800	11.005	0.747	No
15 min Gneg vs. 40 min Gneg	42.650	11.005	<0.001	Yes
15 min Gneg vs. 20 min Gneg	28.050	11.005	<0.001	Yes
15 min Gneg vs. 10 min Gneg	25.150	11.005	<0.001	Yes
15 min Gneg vs. 30 min Gpos	21.950	11.005	<0.001	Yes
15 min Gneg vs. 20 min Gpos	20.650	11.005	<0.001	Yes
15 min Gneg vs. 30 min Gneg	20.450	11.005	<0.001	Yes
15 min Gneg vs. 15 min Gpos	16.800	11.005	0.003	Yes
15 min Gneg vs. Sin Lisozima	13.350	11.005	0.018	Yes
15 min Gneg vs. 40 min Gpos	11.300	11.005	0.044	Yes
40 min Gpos vs. 40 min Gneg	31.350	11.005	<0.001	Yes
40 min Gpos vs. 20 min Gneg	16.750	11.005	0.003	Yes
40 min Gpos vs. 10 min Gneg	13.850	11.005	0.014	Yes
40 min Gpos vs. 30 min Gpos	10.650	11.005	0.058	No
40 min Gpos vs. 20 min Gpos	9.350	11.005	0.095	Do Not Test
40 min Gpos vs. 30 min Gneg	9.150	11.005	0.103	Do Not Test
40 min Gpos vs. 15 min Gpos	5.500	11.005	0.326	Do Not Test
40 min Gpos vs. Sin Lisozima	2.050	11.005	0.714	Do Not Test
Sin Lisozima vs. 40 min Gneg	29.300	11.005	<0.001	Yes
Sin Lisozima vs. 20 min Gneg	14.700	11.005	0.009	Yes
Sin Lisozima vs. 10 min Gneg	11.800	11.005	0.036	Yes
Sin Lisozima vs. 30 min Gpos	8.600	11.005	0.125	Do Not Test
Sin Lisozima vs. 20 min Gpos	7.300	11.005	0.192	Do Not Test
Sin Lisozima vs. 30 min Gneg	7.100	11.005	0.205	Do Not Test
Sin Lisozima vs. 15 min Gpos	3.450	11.005	0.537	Do Not Test
15 min Gpos vs. 40 min Gneg	25.850	11.005	<0.001	Yes
15 min Gpos vs. 20 min Gneg	11.250	11.005	0.045	Yes
15 min Gpos vs. 10 min Gneg	8.350	11.005	0.136	No
15 min Gpos vs. 30 min Gpos	5.150	11.005	0.357	Do Not Test
15 min Gpos vs. 20 min Gpos	3.850	11.005	0.491	Do Not Test
15 min Gpos vs. 30 min Gneg	3.650	11.005	0.514	Do Not Test
30 min Gneg vs. 40 min Gneg	22.200	11.005	<0.001	Yes
30 min Gneg vs. 20 min Gneg	7.600	11.005	0.175	No
30 min Gneg vs. 10 min Gneg	4.700	11.005	0.401	Do Not Test
30 min Gneg vs. 30 min Gpos	1.500	11.005	0.788	Do Not Test

30 min Gneg vs. 20 min Gpos	0.200	11.005	0.971	Do Not Test
20 min Gpos vs. 40 min Gneg	22.000	11.005	<0.001	Yes
20 min Gpos vs. 20 min Gneg	7.400	11.005	0.186	Do Not Test
20 min Gpos vs. 10 min Gneg	4.500	11.005	0.421	Do Not Test
20 min Gpos vs. 30 min Gpos	1.300	11.005	0.816	Do Not Test
30 min Gpos vs. 40 min Gneg	20.700	11.005	<0.001	Yes
30 min Gpos vs. 20 min Gneg	6.100	11.005	0.276	Do Not Test
30 min Gpos vs. 10 min Gneg	3.200	11.005	0.567	Do Not Test
10 min Gneg vs. 40 min Gneg	17.500	11.005	0.002	Yes
10 min Gneg vs. 20 min Gneg	2.900	11.005	0.604	Do Not Test
20 min Gneg vs. 40 min Gneg	14.600	11.005	0.010	Yes

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

Anexo 2 Resultados de las abundancias de bacterias y arqueas

Linea 1														
Muestra	ALFA968 (Alphaproteobacteria)	BETA 42a (Betaproteobacteria)	CF319 b (Flavobacterias)	CFX1223 / GNSB 941 (Cloroflexi)	Ntspa712 Nitrospira	GAM 42 (Gammaproteobacterias)	HGC 69 (Actinobacteria)	LGC354A (Firmicutes)	PLA 46 (Planctomyces)	DELTA 495a (Deltaproteobacteria)	EPS 549 (Epsilonproteobacteria)	SS_HOL14 00 (Acidobacteria)	ARCH915 (Arqueas)	Total Población identificada
10-dic	13 ± 1.6	31 ± 3.8	NC	4 ± 0.5	0.5	19 ± 3.3	NC	NC	4 ± 0.8	2 ± 0.1	0	NC	2 ± 0.7	75
23-dic	13 ± 1.6	33 ± 3.6	NC	3 ± 0.4	0.5	18 ± 2.3	NC	NC	1 ± 0.2	2 ± 0.1	0	NC	3 ± 0.6	73
07-ene	10 ± 1.5	33 ± 3.9	NC	4 ± 0.3	0.5	25 ± 2.4	NC	NC	4 ± 0.7	1 ± 0.1	0	NC	3 ± 0.2	80
21-ene	11 ± 1.1	37 ± 4.1	NC	3 ± 0.5	0.5	18 ± 2.4	NC	NC	3 ± 0.4	2 ± 0.1	0	NC	3 ± 0.3	77
04-feb	12 ± 1	41 ± 3.5	NC	4 ± 0.5	0	19 ± 2.5	NC	NC	3 ± 0.6	2 ± 0.1	0	0	5 ± 0.4	86
18-feb	29 ± 2.8	35 ± 3.4	NC	4 ± 0.6	0.5	17 ± 1.9	NC	NC	5 ± 1.3	2 ± 0.2	0	NC	2 ± 0.2	94
04-mar	25 ± 1.9	42 ± 3	NC	6 ± 0.6	0.5	14 ± 1.8	NC	NC	4 ± 0.6	1 ± 0.1	0	NC	3 ± 0.3	95
01-abr	21 ± 1.6	34 ± 3.3	NC	4 ± 0.5	2 ± 0.3	11 ± 1	NC	NC	1 ± 0.1	3 ± 0.2	0	0	8 ± 1	82
29-abr	9 ± 1.5	24 ± 1.9	NC	3 ± 0.3	3 ± 0.6	11 ± 1.4	NC	NC	4 ± 0.7	2 ± 0.2	0	0	5 ± 0.4	58
13-may	17 ± 1.3	24 ± 1.9	NC	5 ± 0.6	4 ± 0.8	11 ± 2	NC	NC	4 ± 0.5	1 ± 0.1	0	NC	1 ± 0.1	63
27-may	27 ± 1.9	35 ± 3.5	NC	7 ± 0.6	3 ± 0.4	11 ± 1.9	NC	NC	7 ± 0.5	2 ± 0.2	0	NC	4 ± 0.9	93
10-jun	23 ± 1.6	22 ± 2.6	NC	5 ± 0.4	3 ± 0.6	16 ± 2	NC	NC	4 ± 0.4	1 ± 0.1	0	NC	4 ± 0.8	75
24-jun	25 ± 1.8	34 ± 3.2	NC	7 ± 0.8	2 ± 0.5	11 ± 1.5	NC	NC	7 ± 0.8	2 ± 0.2	0	NC	6 ± 0.6	92
08-jul	24 ± 1.7	32 ± 1.5	NC	6 ± 0.6	3 ± 0.3	13 ± 1.6	NC	NC	3 ± 0.4	3 ± 0.3	0	0	2 ± 0.6	83
22-jul	19 ± 1.6	33 ± 2	NC	5 ± 0.6	6 ± 1	8 ± 0.9	NC	NC	9 ± 0.8	3 ± 0.3	0	0	0.5	77.5
16-sep	28 ± 2	18 ± 1.2	NC	6 ± 0.7	3 ± 0.4	24 ± 2.1	NC	NC	9 ± 0.9	1 ± 0.1	0	0	1 ± 0.1	87
30-sep	15 ± 1.7	21 ± 1.5	NC	9 ± 1	8 ± 0.9	14 ± 1.6	NC	NC	10 ± 0.8	3 ± 0.5	0	0	1 ± 0.1	73
14-oct	15 ± 1.4	30 ± 1.6	NC	9 ± 0.8	7 ± 1	12 ± 1.6	NC	NC	6 ± 0.7	1 ± 0.1	0	0	2 ± 0.4	75
27-oct	15 ± 1.5	30 ± 2.3	NC	7 ± 0.8	0	17 ± 2.2	NC	NC	4 ± 0.5	2 ± 0.2	0	0	1 ± 0.2	76
11-nov	19 ± 1.4	40 ± 3.1	NC	10 ± 0.9	0	8 ± 1.1	NC	NC	3 ± 0.4	1 ± 0.1	0	0	2 ± 0.3	83
25-nov	21 ± 2.1	31 ± 3.2	NC	7 ± 1	0	13 ± 1.9	NC	NC	4 ± 0.6	1 ± 0.1	0	NC	3 ± 0.7	80
21-dic	17 ± 1.3	36 ± 2.8	NC	8 ± 0.8	0	12 ± 1.3	NC	NC	8 ± 0.8	2 ± 0.2	0	0	2 ± 0.1	85
Promedio	18.55	31.64		5.62	2.14	14.64			4.71	1.81			2.93	82.03

Estudio de las poblaciones bacterianas y su relación con los parámetros físico químicos del tratamiento de Aguas residuales

Linea 2														
Muestra	ALFA968 (Alphaproteobacteria)	BETA 42a (Betaproteobacteria)	CF319 b (Flavobacterias)	CFX1223 / GNSB 941 (Cloroflexi)	Ntspa712 Nitrospira	GAM 42 (Gammaproteobacterias)	HGC 69 (Actinobacteria)	LGC354A (Firmicutes)	PLA 46 (Planctomyces)	DELTA 495a (Deltaproteobacteria)	EPS 549 (Epsilonproteobacteria)	SS_HOL14 00 (Acidobacteria)	ARCH915 (Arqueas)	Total Población identificada
10-dic	12 ± 1.1	38 ± 3.4	NC	4 ± 0.5	0.5	21 ± 2.8	NC	NC	3 ± 0.7	1 ± 0.1	0	NC	3 ± 0.7	82.5
23-dic	15 ± 2	38 ± 3.2	NC	3 ± 0.5	0.5	18 ± 1.7	NC	NC	6 ± 0.9	2 ± 0.2	0	NC	2 ± 0.1	84.5
07-ene	9 ± 1	26 ± 2.3	NC	4 ± 0.5	0	22 ± 2.4	NC	NC	2 ± 0.4	2 ± 0.1	0	NC	2 ± 0.2	67
21-ene	13 ± 2	26 ± 1.9	NC	4 ± 0.6	0	19 ± 2.5	NC	NC	2 ± 0.3	2 ± 0.2	0	NC	8 ± 0.6	74
04-feb	13 ± 1.2	41 ± 4.1	NC	4 ± 0.4	0	14 ± 1.7	NC	NC	3 ± 0.7	2 ± 0.1	0	0	1 ± 0.1	78
18-feb	25 ± 2	35 ± 3.1	NC	6 ± 0.7	0.5	16 ± 2.3	NC	NC	3 ± 0.4	2 ± 0.2	0	NC	3 ± 0.3	90.5
04-mar	22 ± 1.4	48 ± 3.5	NC	4 ± 0.6	0.5	14 ± 1.3	NC	NC	1 ± 0.1	2 ± 0.2	0	NC	3 ± 0.2	94.5
01-abr	19 ± 1.6	43 ± 2.9	NC	2 ± 0.2	2 ± 0.4	13 ± 1.3	NC	NC	3 ± 0.4	1 ± 0.1	0	0	7 ± 0.6	90
29-abr	14 ± 1.9	27 ± 3	NC	4 ± 0.3	2 ± 0.3	10 ± 1.6	NC	NC	4 ± 0.5	2 ± 0.2	0	0	3 ± 0.3	66
13-may	14 ± 1.3	29 ± 1.9	NC	4 ± 0.4	2 ± 0.3	13 ± 1.2	NC	NC	5 ± 0.5	1 ± 0.1	0	0	1 ± 0.1	69
27-may	22 ± 1.7	34 ± 3.7	NC	5 ± 0.4	2 ± 0.4	9 ± 1.1	NC	NC	10 ± 0.8	2 ± 0.2	0	NC	7 ± 0.8	91
10-jun	23 ± 1.5	26 ± 3	NC	4 ± 0.4	3 ± 0.5	18 ± 1.9	NC	NC	5 ± 0.7	2 ± 0.2	0	NC	5 ± 0.7	86
24-jun	18 ± 1.9	35 ± 1.7	NC	6 ± 0.8	2 ± 0.5	13 ± 1.2	NC	NC	5 ± 0.7	1 ± 0.1	0	NC	4 ± 0.6	84
08-jul	21 ± 1.4	32 ± 1.9	NC	3 ± 0.5	3 ± 0.5	7 ± 0.9	NC	NC	4 ± 0.4	2 ± 0.2	0	0	2 ± 0.4	74
22-jul	21 ± 1.7	28 ± 1.9	NC	5 ± 0.5	5 ± 1	13 ± 1.7	NC	NC	8 ± 0.9	1 ± 0.1	0	0	0.5	81.5
16-sep	27 ± 1.4	17 ± 1	NC	5 ± 0.6	4 ± 0.6	16 ± 1.6	NC	NC	7 ± 0.8	2 ± 0.2	0	0	1 ± 0.1	79
30-sep	15 ± 1.4	20 ± 1	NC	11 ± 0.3	6 ± 0.4	14 ± 1.9	NC	NC	9 ± 0.9	2 ± 0.3	0	0	1 ± 0.1	78
14-oct	16 ± 1.7	36 ± 1.7	NC	7 ± 0.7	6 ± 0.7	11 ± 1.5	NC	NC	4 ± 0.5	1 ± 0.1	0	0	1 ± 0.2	82
27-oct	17 ± 1.3	35 ± 2.9	NC	7 ± 1	0	12 ± 2.2	NC	NC	5 ± 0.4	1 ± 0.1	0	0	2 ± 0.3	79
11-nov	20 ± 1.6	40 ± 2.4	NC	10 ± 1.4	0	13 ± 2	NC	NC	4 ± 0.5	1 ± 0.1	0	0	1 ± 0.3	89
25-nov	16 ± 1.6	34 ± 2.8	NC	10 ± 0.6	0	19 ± 2	NC	NC	4 ± 0.4	1 ± 0.1	0	0	2 ± 0.3	86
21-dic	17 ± 1.1	32 ± 2.8	NC	10 ± 0.8	0	12 ± 1.5	NC	NC	5 ± 0.6	2 ± 0.2	0	0	2 ± 0.1	80
Promedio	17.68	32.73		5.33	1.77	14.41			4.62	1.57			2.83	80.95

Estudio de las poblaciones bacterianas y su relación con los parámetros físico químicos del tratamiento de Aguas residuales

Linea 1																			
Muestra	Nitrificantes	PAO	GAO		Metanotrofas		Desnitrificantes		SRB δ -proteobacteria		SRB Clostridia	SRB Total		Arqueas Metanogénicas			Acidogénica/Acetogénica		Total Población identificada
	NSO 1225 LNA	PAO MIX	GAO MIX	DFO MIX 2	MA464	MG 84	AT 1458	PAR 651	DSV687	DNMA 657	Dtm230	SRB385	SRB 385Db	MSMX 860	MG 1200b	MB311	Clos621	STREP	
10-dic	6 ± 1.4	2 ± 0.5	0.5	3 ± 0.6	1 ± 0.1	0.5	14 ± 1.5	0.5	0.5	5 ± 1	0.5	9 ± 1.5	5 ± 0.9	0	0.5	1 ± 0.2	1	1	44.5
23-dic	7 ± 1.4	1 ± 0.2	0.5	0	1 ± 0.1	0.5	15 ± 1.4	0.5	0.5	8 ± 1.5	0.5	6 ± 0.8	7 ± 1.1	0.5	0.5	1 ± 0.2	1	1	42
07-ene	4 ± 0.5	2 ± 0.4	0.5	2 ± 0.4	0.5	0.5	19 ± 0.9	0.5	0.5	4 ± 0.9	0.5	4 ± 0.8	7 ± 1.1	0	0.5	1 ± 0.2	1	1	43
21-ene	2 ± 0.3	0.5	0.5	0	0.5	0.5	22 ± 2.3	0.5	0.5	3 ± 0.4	0.5	15 ± 2.2	6 ± 1.1	0.5	0	0.5	1	1	50
04-feb	3 ± 0.3	0.5	0.5	2 ± 0.4	0.5	0.5	18 ± 1.5	0.5	0.5	5 ± 0.6	0.5	7 ± 1.3	4 ± 0.7	0.5	0.5	1 ± 0.1	1	1	40
18-feb	7 ± 1	0.5	0.5	4 ± 0.5	0.5	0.5	16 ± 1.4	0.5	0.5	2 ± 0.4	0.5	13 ± 1.4	7 ± 0.9	0.5	0.5	3 ± 0.6	1	1	55
04-mar	5 ± 0.7	2 ± 0.4	0.5	1 ± 0.2	1 ± 0.1	0.5	13 ± 1.2	0.5	0.5	3 ± 0.6	0.5	14 ± 1.8	5 ± 0.8	0.5	0	0.5	1	1	45
01-abr	8 ± 0.9	0.5	0.5	3 ± 0.6	0.5	0.5	12 ± 1.3	0.5	0.5	4 ± 0.8	0.5	8 ± 0.5	9 ± 1.3	0.5	0.5	2 ± 0.3	1	1	47
29-abr	6 ± 0.7	0	0.5	3 ± 0.6	0.5	0.5	7 ± 0.8	0.5	0.5	5 ± 1	0.5	11 ± 1	13 ± 0.3	0.5	0.5	1 ± 0.2	0	1	44.5
13-may	9 ± 0.7	0.5	0	0	0	0.5	7 ± 0.8	0.5	0.5	3 ± 0.4	0.5	8 ± 1	10 ± 0.1	0	0	3 ± 0.5	1	1	40
27-may	7 ± 0.8	0	0	2 ± 0.5	0.5	0.5	12 ± 1.1	0.5	0.5	5 ± 0.8	0.5	9 ± 1.3	12 ± 1.7	0.5	0	1 ± 0.3	0	1	45.5
10-jun	7 ± 0.4	1 ± 0.4	0	0.5	0.5	0.5	10 ± 1.1	0.5	0.5	7 ± 0.9	0.5	6 ± 0.8	11 ± 1.3	0	0	0.5	0	1	38
24-jun	8 ± 0.7	0.5	0.5	1 ± 0.1	0.5	0.5	19 ± 2	0.5	0.5	10 ± 1.4	0.5	9 ± 1.3	10 ± 1	0	0	0.5	0	1	50.5
08-jul	7 ± 0.8	1 ± 0.1	0.5	2 ± 0.4	0.5	0.5	18 ± 1.9	0.5	0.5	6 ± 1	0.5	7 ± 1.1	10 ± 1.5	0	0	1 ± 0.1	1	1	49.5
22-jul	7 ± 0.7	1 ± 0.2	0.5	3 ± 0.6	0.5	0.5	14 ± 2	0.5	0.5	8 ± 1.1	0.5	11 ± 1.1	11 ± 1.1	0	0	1 ± 0.1	1	1	51.5
16-sep	9 ± 1.1	5 ± 0.6	0	0.5	0.5	0.5	9 ± 1	0.5	0.5	2 ± 0.3	0.5	11 ± 1.1	12 ± 1.3	0.5	0	1 ± 0.1	0	1	50
30-sep	10 ± 1.1	3 ± 0.4	0	0.5	0.5	0.5	6 ± 0.9	0	0.5	4 ± 0.8	0.5	11 ± 1.1	11 ± 1.6	0.5	0.5	0.5	0	1	49
14-oct	11 ± 1.2	3 ± 0.4	0	0	0.5	0.5	6 ± 1	0.5	0.5	3 ± 0.5	0.5	12 ± 0.9	6 ± 0.9	0.5	0.5	0.5	1	1	42.5
27-oct	9 ± 1.2	3 ± 0.4	0	0	0.5	0.5	14 ± 1.4	0.5	0.5	4 ± 0.6	0.5	6 ± 0.8	11 ± 1.5	0.5	0.5	0.5	1	1	47.5
11-nov	9 ± 1.1	2 ± 0.2	0	0	0.5	0.5	14 ± 1.2	0.5	0.5	5 ± 1	0.5	8 ± 0.8	14 ± 1.5	0.5	0.5	0.5	1	1	51.5
25-nov	7 ± 0.9	2 ± 0.4	0	0.5	0.5	0.5	17 ± 1.8	0.5	0.5	5 ± 0.4	0.5	10 ± 1.4	8 ± 1.4	0	0.5	1 ± 0.4	1	1	49
21-dic	6 ± 0.6	0.5	0	0.5	0.5	0.5	5 ± 0.7	0.5	0.5	7 ± 0.7	0.5	11 ± 1.1	16 ± 1.3	0	0	0.5	0	1	41.5
Promedio	7.00	1.43	0.27	1.30			13.05			4.91		9.36	9.32	0.30	0.27	1.02	0.68		46.23

Linea 2																			
Muestra	Nitrificantes	PAO	GAO		Metanotrofas		Desnitrificantes		SRB δ-proteobacteria		SRB Clostridia	SRB Total		Arqueas Metanogénicas			Acidogénica/Acetogénica		Total Población identificada
	NSO 1225 LNA	PAO MIX	GAO MIX	DFO MIX 2	MA464	MG 84	AT 1458	PAR 651	DSV687	DNMA 657	Dtm230	SRB385	SRB 385Db	MSMX 860	MG 1200b	MB311	Clos621	STREP	
10-dic	7 ± 0.8	2 ± 0.4	0.5	2 ± 0.4	1 ± 0.1	0.5	19 ± 2	0.5	0.5	5 ± 1.2	0.5	13 ± 1.6	6 ± 0.7	0.5	0.5	1 ± 0.3	1	0.5	55
23-dic	3 ± 0.4	3 ± 0.7	0.5	3 ± 0.7	0.5	0.5	10 ± 0.9	0.5	0.5	7 ± 0.9	0.5	6 ± 0.8	7 ± 1	0.5	0.5	1 ± 0.3	1	0.5	37.5
07-ene	4 ± 0.5	1 ± 0.2	0.5	1 ± 0.3	0.5	0.5	19 ± 1.7	0.5	0.5	6 ± 1.1	0.5	5 ± 0.9	3 ± 0.4	0.5	0.5	0.5	1	0.5	38
21-ene	4 ± 0.5	1 ± 0.2	0.5	2 ± 0.4	0.5	0.5	12 ± 1.3	0.5	0.5	3 ± 0.4	0.5	13 ± 1.9	4 ± 0.7	0.5	0	0.5	1	0.5	40.5
04-feb	2 ± 0.3	2 ± 0.3	0.5	3 ± 0.6	0.5	0.5	21 ± 1.4	0.5	0.5	4 ± 0.7	0.5	14 ± 2	7 ± 1.1	0.5	0.5	1 ± 0.1	1	0.5	54.5
18-feb	5 ± 0.6	2 ± 0.4	0.5	3 ± 0.4	0.5	0.5	12 ± 1.1	0.5	0.5	3 ± 0.6	0.5	8 ± 0.8	4 ± 0.5	0.5	0.5	2 ± 0.6	1	0.5	40.5
04-mar	5 ± 0.7	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	10 ± 1.1	0.5	0.5	5 ± 1.1	0.5	8 ± 1.1	8 ± 1.2	0.5	0	0.5	1	0.5	36.5
01-abr	7 ± 0.6	0.5	0.5	1 ± 0.1	0.5	0.5	10 ± 0.9	0.5	0.5	7 ± 1	0.5	8 ± 0.9	8 ± 0.9	0.5	0.5	1 ± 0.1	1	0.5	40
29-abr	8 ± 0.9	0.5	0.5	1 ± 0.2	0	0.5	8 ± 1	0.5	0.5	5 ± 0.5	0.5	13 ± 1.5	8 ± 0.8	0.5	0	2 ± 0.3	0	0.5	43
13-may	7 ± 0.7	0	0	0	0	0.5	9 ± 1	0.5	0.5	4 ± 0.9	0.5	12 ± 1.2	11 ± 1.1	0	0.5	3 ± 0.5	1	0.5	45
27-may	8 ± 0.7	1 ± 0.4	0	1 ± 0.1	0.5	0.5	19 ± 2	0.5	0.5	4 ± 0.5	0.5	8 ± 0.7	12 ± 1.1	0.5	0	0.5	0	0.5	52
10-jun	8 ± 1	1 ± 0.1	0	3 ± 0.7	0.5	0.5	9 ± 0.8	0.5	0.5	5 ± 0.5	0.5	12 ± 0.8	11 ± 1	0	0	0.5	1	0.5	47.5
24-jun	6 ± 0.4	1 ± 0.2	0.5	2 ± 0.5	0.5	0.5	10 ± 1.1	0.5	0.5	5 ± 1.6	0.5	7 ± 0.8	8 ± 1	0	0	0.5	1	0.5	38
08-jul	7 ± 0.7	2 ± 0.4	0.5	2 ± 0.5	0.5	0.5	13 ± 1.4	0.5	0.5	4 ± 0.5	0.5	7 ± 1.3	9 ± 0.9	0	0	1 ± 0.1	1	0.5	44.5
22-jul	9 ± 0.8	3 ± 0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	15 ± 1.3	0.5	0.5	6 ± 0.9	0.5	11 ± 1	11 ± 1.1	0.5	0.5	1 ± 0.1	1	0.5	55
16-sep	8 ± 0.9	5 ± 0.6	0	0	0	0.5	10 ± 1.2	0.5	0.5	4 ± 1	0.5	12 ± 1	10 ± 0.9	0.5	0.5	0.5	1	0.5	49
30-sep	8 ± 0.8	3 ± 0.4	0	0	0.5	0.5	5 ± 0.7	0.5	0.5	2 ± 0.3	0.5	12 ± 1.1	16 ± 1.7	0.5	0.5	0.5	0	0.5	47.5
14-oct	10 ± 1	4 ± 0.5	0	0.5	0.5	0.5	7 ± 1.5	0.5	0.5	2 ± 0.5	0.5	11 ± 1	11 ± 1.4	0.5	0.5	0.5	1	0.5	47.5
27-oct	9 ± 1.2	3 ± 0.4	0.5	0.5	0.5	0.5	15 ± 1.7	0.5	0.5	3 ± 0.4	0.5	10 ± 1	13 ± 1.5	0.5	0.5	0.5	1	0.5	55
11-nov	6 ± 0.6	3 ± 0.4	0.5	0.5	0.5	0.5	15 ± 1.3	0.5	0.5	6 ± 0.8	0.5	11 ± 1	13 ± 1.2	0.5	0.5	0.5	1	0.5	53
25-nov	3 ± 0.3	3 ± 0.3	0	1 ± 0.3	0.5	0.5	21 ± 1.6	0.5	0.5	6 ± 0.9	0.5	9 ± 1.1	14 ± 1.9	0	0	0.5	1	0.5	54.5
21-dic	7 ± 0.9	0.5	0	1 ± 0.2	0.5	0.5	14 ± 1.3	0.5	0.5	6 ± 0.8	0.5	9 ± 1.5	15 ± 1.9	0	0	0	0	0.5	48.5
Promedio	6.41	1.91	0.19	1.23			12.86			4.64		9.95	9.50	0.36	0.30	0.86	0.82		46.48

Anexo 3. Tablas conteo Protozoos

Línea 1																													
	Peranema Trichophorum	Entosiphon	Arceia sp.	Pyxidicula operculata	Amoeba < 50 µm	Litonotus lamella	Acineta tuberosa	Periacineta sp.	Uronema nigricans	Aspidiscicada	Trithigmostoma cucullulus	Euplotes affinis	Pseudochilodopsis fluvialis	Trochila minuta	Gastronauta membranaceus	Acineria uncinata	Opercularia articulata	Epistylis plicatilis	Epistylis chrysemidis	Epistylis balatonica	Vorticella aquadulcis	Vorticella convallaria	Carchesium polypinum	Opercularia coarctata	Vorticella infusionum	Vorticella microstoma	Rotaria sp.	Lecane sp.	Nematodo
10-dic	0	0	40	0	920	0	0	0	20	5840	0	20	0	60	0	1980	0	0	13	0	2160	1160	33	340	0	40	0	0	40
23-dic	0	0	0	0	460	100	0	0	20	2440	0	80	0	400	0	1100	0	0	173	0	1840	1980	87	640	0	200	0	0	60
07-ene	0	0	0	0	1700	40	0	0	60	1560	60	80	0	300	20	2280	0	0	20	0	860	600	340	433	1180	20	0	0	0
21-ene	0	0	140	0	12660	200	0	0	20	220	20	0	100	380	0	0	0	0	0	140	1340	340	0	0	1140	100	20	80	0
04-feb	60	0	20	0	820	120	0	0	560	660	0	160	860	640	260	1840	0	167	0	940	300	0	0	0	0	0	0	40	20
18-feb	1220	160	2020	0	13420	140	360	140	100	0	0	20	0	0	180	120	53	173	500	0	520	20	40	320	0	100	20	120	0
04-mar	760	600	1540	0	1800	40	620	120	80	620	0	0	460	620	140	1800	80	887	0	0	2480	20	640	0	0	140	200	400	0
01-abr	340	2560	20	0	4200	0	40	0	60	340	0	0	100	0	0	1420	367	213	0	267	1020	60	0	0	0	0	100	1080	0
29-abr	300	1600	1280	700	17540	0	600	20	160	340	0	0	160	20	760	2840	67	2207	20	753	580	20	0	0	0	0	200	820	0
13-may	200	0	160	180	1160	0	60	120	260	2700	0	480	0	0	0	6740	0	2100	0	647	180	60	53	0	60	100	300	880	0
27-may	360	38420	0	20	1460	0	60	320	460	3180	0	0	0	0	20	200	927	2280	13	1160	380	160	247	0	20	160	140	1740	0
10-jun	20	0	100	0	400	0	0	0	0	3960	0	200	20	740	0	1280	0	0	573	153	2060	100	0	240	0	40	0	20	0
24-jun	0	0	0	0	180	0	0	0	20	10220	0	200	0	60	0	220	0	0	0	0	2840	1160	0	1920	0	80	0	0	20
08-jul	0	0	0	0	1180	0	0	0	0	400	0	220	0	660	0	900	6	0	0	0	440	840	60	280	420	100	0	20	0
22-jul	0	0	40	0	672	0	0	0	16	2083	0	0	0	2251	16	890	0	0	0	0	386	0	0	134	117	184	0	0	0
16-sep	20	0	0	0	1360	60	20	60	40	200	0	500	380	280	220	2060	0	0	0	506	1200	180	160	360	6060	700	0	120	0
30-sep	100	3480	1220	0	13180	160	440	300	200	760	0	420	20	280	40	1920	0	46	0	80	1400	20	260	20	0	0	20	60	20
14-oct	560	880	400	0	1220	140	440	220	100	1440	0	0	2260	440	200	1440	186	1700	93	746	3160	40	540	0	0	0	340	220	60
27-oct	100	140	1020	0	500	0	380	0	40	580	0	0	20	40	0	240	1820	300	40	46	420	60	20	0	0	0	160	540	20
11-nov	600	160	1500	1480	2320	0	260	60	80	2460	0	0	40	0	280	2540	473	40	0	40	580	180	13	0	0	0	120	440	20
25-nov	160	100	260	1020	800	20	200.34	60.48	39.69	1220	0	0	0	0	0	2200	113	260	0	0	320	60	0	0	20	60	180	680	0
21-dic	280	24860	60	0	2760	0	100	20	240	1200	0	320	140	0	40	260	0	506	0	413	820	580	140	0	0	240	100	380	20

Estudio de las poblaciones bacterianas y su relación con los parámetros físico químicos del tratamiento de Aguas residuales

Línea 2																													
	Peranema Trichophorum	Entosiphon	Arceia sp.	Pyxidicula operculata	Amoeba < 50 µm	Litonotus lamella	Acineta tuberosa	Periacineta sp.	Uronema nigricans	Aspidiscicada	Trithigmostoma cucullulus	Euplotes affinis	Pseudochilodopsis fluvialis	Trochila minuta	Gastronauta membranaceus	Acinertia uncinata	Opercularia articulata	Epistylis plicatilis	Epistylis chrysemidis	Epistylis balatonica	Vorticella aquadulcis	Vorticella convallaria	Carchesium polypinum	Opercularia coarctata	Vorticella infusorium	Vorticella microstoma	Rotaria sp.	Lecane sp.	Nematodo
10-dic	20	0	0	0	500	0	0	0	40	2540	0	20	0	140	0	320	0	0	160	0	4920	1400	60	920	0	60	20	20	40
23-dic	0	0	0	0	1520	0	0	0	0	160	0	1300	0	0	0	100	0	0	107	0	900	3340	0	1220	0	160	0	20	40
07-ene	100	0	0	0	5480	380	0	0	0	480	360	220	20	300	20	60	0	0	0	0	140	0	0	0	180	80	20	40	20
21-ene	60	0	0	0	2400	0	0	0	20	360	0	140	0	240	0	320	0	0	0	180	2680	80	40	20	240	60	20	0	0
04-feb	0	20	1100	0	8560	880	140	0	120	80	0	0	0	0	0	5360	0	380	0	233	700	840	20	120	0	120	0	1180	0
18-feb	1800	280	180	0	3620	60	140	160	660	580	0	0	740	1760	240	880	570	170	0	180	1060	100	193	40	0	0	140	200	40
04-mar	160	160	3360	4280	1960	100	160	40	40	780	0	0	60	40	160	40	113	1783	0	393	100	0	1680	0	0	0	200	1100	0
01-abr	680	720	3300	180	2380	0	160	200	0	860	0	0	160	60	140	4600	133	720	0	467	1020	0	0	0	0	20	40	740	0
29-abr	980	360	20	6780	500	0	0	20	160	360	0	0	0	0	0	3300	100	60	0	0	500	40	213	0	0	40	40	540	0
13-may	1960	560	80	0	6840	0	440	180	40	2220	0	60	0	0	0	0	0	0	33	120	1840	0	127	0	40	1100	160	520	20
27-may	660	20	340	0	7540	0	20	0	0	500	0	0	20	40	60	760	0	1587	0	127	60	0	113	0	0	20	120	1420	0
10-jun	20	0	100	0	440	0	0	0	0	4140	0	160	0	820	0	460	0	0	0	0	3220	680	0	300	0	40	0	40	40
24-jun	0	0	0	0	640	0	0	0	80	5600	0	600	0	40	0	80	0	0	0	0	2880	2360	0	1100	0	0	0	0	0
08-jul	0	0	0	0	3740	0	0	0	0	820	0	20	0	1980	0	5080	0	0	0	0	840	940	100	320	1120	60	0	0	0
22-jul	0	0	0	0	1800	20	0	0	0	920	40	20	40	140	0	1300	0	0	0	0	1420	60	420	420	260	80	0	0	0
16-sep	20	540	160	0	2860	180	80	20	60	380	0	20	80	60	620	80	0	86	0	220	2160	220	146	0	20	20	80	440	20
30-sep	1540	1885	60	0	8520	77	97	116	320	680	0	0	466	20	0	622	0	326	71	60	388	0	38	0	0	0	97	220	20
14-oct	160	2180	1060	4820	3100	100	220	160	60	780	0	500	120	0	100	1160	2060	920	0	540	1700	60	1533	0	0	20	240	240	0
27-oct	440	480	900	1400	1780	0	180	80	0	240	0	0	740	20	680	380	333	13	0	0	480	40	0	0	0	80	0	100	20
11-nov	300	3340	120	820	740	0	180	40	320	1200	0	0	20	20	260	3340	6	1293	0	226	1320	340	840	0	60	180	140	660	0
25-nov	1080	820	560	0	6980	0	340	300	400	2460	0	0	80	0	0	0	93	286	60	26	1740	20	13	0	200	1600	220	320	40
21-dic	520	20	20	20	2260	0	220	80	400	4480	0	0	0	80	880	180	280	246	13	333	360	40	13	0	0	820	160	780	0

Anexo 4. Tabla de rangos de oxígeno, nitrógeno, fósforo y sulfatos

Muestra	OD(mg/L) Línea 1	OD(mg/L) Línea 2	NT(mg/L) Línea 1	NT(mg/L) Línea 2	NT(mg/L) efluente	PT(mg/L) Línea 1	PT(mg/L) Línea 2	PT(mg/L) efluente	Sulfato(mg/L) afluente	Sulfato(mg/L) efluente
10-dic	1.99	1.84	186	164	24.60	34	38	2.12	287	193
23-dic	2.00	1.92	258	244	29.10	48	46	2.80	360	360
07-ene	2.02	1.81	200	224	35.40	42	49	2.23	327	327
21-ene	2.00	1.85	254	264	36.60	62	62	3.32	414	348
04-feb	1.97	1.75	222	196	38.90	51	41	3.53	336	306
18-feb	2.00	1.97	226	208	33.80	55	52	2.72	392	372
04-mar	1.73	1.78	144	172	24.50	42	46	1.69	183	310
01-abr	1.83	1.71	126	110	16.30	34	28	1.74	324	156
29-abr	1.96	1.73	100	152	17.60	23	39	2.70	260	265
13-may	1.91	1.60	164	134	23.90	39	26	3.05	319	352
27-may	1.99	1.49	140	144	16.90	29	32	2.69	429	392
10-jun	1.98	1.63	110	98	16.65	37	31	2.39	391	435
24-jun	1.99	1.57	106	158	20.16	34	41	2.62	392	439
08-jul	2.00	1.48	92	110	19.10	24	33	2.54	333	329
22-jul	2.01	1.91	87	88	20.50	22	23	2.30	361	413
16-sep	2.01	1.48	176	140	15.95	62	45	2.73	225	224
30-sep	2.01	1.70	178	130	8.85	54	45	1.32	323	180
14-oct	2.01	1.72	154	160	16.90	43	58	2.34	362	351
27-oct	2.01	1.74	154	138	17.00	37	42	2.72	344	339
11-nov	2.01	1.22	214	204	21.10	50	59	2.30	343	365
25-nov	2.01	1.91	196	144	17.96	47	34	2.92	369	358
21-dic	2.01	1.76	178	170	28.30	38	35	3.44	384	348
Mínimos	1.73	1.22	87	88	8.85	22	23	1.32	183	156
Máximos	2.02	1.97	258	264	38.90	62	62	3.53	429	439

