



Título del Trabajo Fin de Máster:

*Estudio de las relaciones de Gordonia con
parámetros operacionales y físico-químicos
en EDAR de la Comunidad Valenciana*

Intensificación:

TRATAMIENTO DE AGUAS

Autor:

NÚÑEZ CABEZAS, JOSE MIGUEL

Director/es:

DR. ALONSO MOLINA, JOSÉ LUIS

DR. MARTÍN MONERRIS, MIGUEL

Fecha: **NOVIEMBRE, 2013**



Título del Trabajo Fin de Máster:

Estudio de las relaciones de Gordonia con parámetros operacionales y físico-químicos en EDAR de la Comunidad Valenciana

Autor: ***NÚÑEZ CABEZAS, JOSE MIGUEL***

Tipo	A <input checked="" type="checkbox"/> B <input type="checkbox"/>	Lugar de Realización	VALENCIA
Director	<i>DR. MARTÍN MONERRIS, MIGUEL</i>	Fecha de Lectura	<i>Nov., 2013</i>
Codirector1	<i>DR. ALONSO MOLINA, JOSÉ LUIS</i>		
Codirector2			
Tutor	<i>DR. ALONSO MOLINA, JOSÉ</i>		

Resumen:

Castellano

En los procesos de depuración de aguas residuales de tipo convencional se desarrollan centenares de miles de tipos distintos de microorganismos que constituyen en los reactores biológicos auténticos ecosistemas que presentan una dinámica cambiante debido a las características del afluente, factores ambientales y propios de las especies que conforman ese ecosistema. La dinámica poblacional de los fangos evoluciona con muchísima rapidez ya que los microorganismos que los componen desarrollan nuevas generaciones en días y en ocasiones en horas. Los desequilibrios poblacionales pueden producir multitud de problemas en el desarrollo de los procesos de depuración que van desde la imposibilidad de sedimentabilidad de los fangos, hasta la formación de espumas biológicas, foaming, que en definitiva alteran la calidad del efluente deseado. El foaming se produce en circunstancias en las que bacterias, generalmente Mycolatas, forman espumas generando problemas en los reactores biológicos, decantadores secundarios o clarificadores o incluso en los digestores de fangos. Esto no se traduce exclusivamente en la molesta emulsión del fango que desborda los tanques, sino que además se traduce en un descenso drástico en la calidad del efluente, en problemas de carácter sanitarios para los operarios de planta y un incremento en los costes de operación por la limpieza y eliminación de las espumas. Los objetivos del presente trabajo han sido el estudio de uno de los géneros que han sido señalados en estudios precedentes como causantes de fenómenos de foaming. Se trata del género Gordonia el cual está compuesto por casi tres decenas de bacterias de las cuales varias especies son causantes de infecciones respiratorias graves. De ahí la importancia de encontrar qué mecanismos llevan a estas bacterias a desarrollar espumas.

Se ha realizado un estudio de la población de dicho género a lo largo de un año en dos EDAR de la Comunidad Valenciana. La EDAR de Quart-Benager y la EDAR de Castellón de la Plana, las cuales presentaban problemas de espumas de carácter biológico. Se muestrearon los fangos de los reactores biológicos durante dicho año con un periodo de muestreo de 15 días aproximadamente y se monitorizaron parámetros de funcionamiento de las EDAR que se engloban en tres grupos: parámetros físico-químicos, operacionales y del licor de mezcla.

Las muestras de fangos recogidas fueron fijadas y tratadas mediante la técnica FISH para poder realizar una identificación del género Gordonia y de esta manera poder realizar una cuantificación de los filamentos existentes en los flóculos mediante el índice subjetivo de Eikelboom. Una vez se realizaron todas las hibridaciones y las cuantificaciones mediante la observación con microscopio de epifluorescencia, se realizó un estudio estadístico de carácter exploratorio mediante el empleo de dos herramientas estadísticas como son; el coeficiente de correlación de Spearman y el Análisis de

Componentes Principales (PCA). Se seleccionaron mediante análisis exploratorios previos qué parámetros presentaban mayor significancia frente a la población de *Gordonia*, estos parámetros fueron expuestos con detalle y comparados con los estudios existentes en la materia a fin de poder extrapolar conclusiones.

Las conclusiones obtenidas son; que las hibridaciones realizadas mediante la técnica FISH corroboraron las observaciones realizadas mediante microscopía tradicional confirmando que los *Mycolata* observados eran del género *Gordonia*; los compuestos del nitrógeno y fósforo presentan una influencia muy significativa en la evolución de filamentos del género *Gordonia*; la temperatura y el contenido en aceites y grasas ha presentado una relación muy significativa con la población de *Gordonia*.

Valencià

En els processos de depuració d'aigües residuals de tipus convencional es desenrotllen centenars de milers de tipus diferents de microorganismes que constitueixen en els reactors biològics autèntics ecosistemes que presenten una dinàmica canviant a causa de les característiques de l'afluent, factors ambientals i propis de les espècies que conformen eixe ecosistema. La dinàmica poblacional dels fangs evoluciona amb moltíssima rapidesa ja que els microorganismes que els componen desenrotllen noves generacions en dies i de vegades en hores. Els desequilibris poblacionals poden produir multitud de problemes en el desenrotllament dels processos de depuració que van des de la impossibilitat de sedimentabilitat dels fangs, fins a la formació de bromeres biològiques, foaming, que en definitiva alteren la qualitat de l'efluent desitjat. El foaming es produïx en circumstàncies en què bacteris, generalment *Mycolatas*, formen bromeres generant problemes en els reactors biològics, decantadors secundaris o clarificadors o inclús en els digestors de fangs. Açò no es traduïx exclusivament en la molesta emulsió del fang que desborda els tancs, sinó que a més es traduïx en un descens dràstic en la qualitat de l'efluent, en problemes de caràcter sanitaris per als operaris de planta i un increment en els costos d'operació per la neteja i eliminació de les bromeres. Els objectius d'aquest treball van ser l'estudi d'un dels gèneres que han estat identificades en estudis previs per provocar fenòmens d'escuma. És del gènere *Gordonia*. El gènere *Gordonia* consisteix en bacteris de gairebé tres dotzenes que diverses espècies són causa de greus infeccions respiratòries. Per tant, la importància de trobar mecanismes per conduir a aquests bacteris desenvolupar bromeres.

Se ha realitzat un estudi de la població d'aquest gènere a l'any en dues EDAR a la Comunitat Valenciana. L'EDAR de Quart-Benager i EDAR Castelló de la Plana, que presenta problemes d'escuma de caràcter biològic. Els fangs de reactors biològics es van mostrejar durant l'exercici amb un mostreig de període de 15 dies aproximadament i es controla funcionament paràmetres de l'EDAR que cauen en tres grups: paràmetres físico-químics, operacionals i del licor mescla.

Les mostres de fangs recollits van ser fix i tractats mitjançant la tècnica FISH per fer una identificació del gènere *Gordonia* i així realitzar una quantificació dels filaments en els flòculs conjuntament per la taxa subjectiu dels Eikelboomm. Una vegada hi havia totes les hibridacions i quantificacions amb mitjançant la observació microscòpica epi-fluorescència, es va realitzar una enquesta de caràcter exploratori mitjançant l'ús de dues eines estadístiques com; el coeficient de correlació de Spearman i el anàlisi de components principals (PCA). Ells van ser seleccionats mitjançant anàlisi exploratòria preliminar que paràmetres tingut major significat contra la població de *Gordonia*, aquests paràmetres van ser exposats en detall i en comparació amb els estudis existents per tal de ser capaços d'extrapolar conclusions.

Els resultats són; les hibridacions realitzades a través de la tècnica FISH corroborats les observacions formulades mitjançant microscòpia tradicional confirmant que eren la *Mycolata* observada del gènere *Gordonia*; nitrogen i fòsfor compostos tenen una influència molt important en l'evolució dels filaments *Gordonia* gènere; la temperatura i contingut en olis i greixos ha presentat una relació molt significativa de la població de *Gordonia*.

English

*Hundreds of thousands of different types of microorganisms grow in conventional wastewater treatment processes which, when found in biological reactors, constitute real ecosystems. These exhibit changing dynamics due to the characteristics of the effluent, environmental factors and others which are specific to the species of that ecosystem. Sludge population dynamics evolve extremely quickly as those microorganisms that compose them develop new generations in days and sometimes within hours. Population imbalances can cause many problems in the development of purification processes, ranging from the inability of the sludge settleability, to foaming, which eventually alters the desired effluent quality. Foaming occurs in circumstances where bacteria, usually *Mycolata* spp., form foam generating problems in biological reactors, secondary clarifiers or even sludge digesters. This not only results in annoying emulsion, mud overflowing tanks, but it also becomes a drastic decline in the quality of the effluent, health issues for plant operators and an increase in cleaning and elimination of foam operating costs. The following thesis studies one of the genres that have been identified in previous studies as a cause of the foaming phenomena. The *Gordonia*, a genus made up of almost three dozen bacteria, of which several species are responsible for severe respiratory infections. Hence the importance of finding what mechanisms lead to these bacteria to develop foam.*

We have performed a study of the population of this genre a year in two WWTP in the Valencian Community. The WWTP Quart-Benager and WWTP Castellón de la Plana, which presented problems of foam of biological character. The sludge of biological reactors were sampled during that year with a sampling of 15 days period approximately and is monitored operating parameters of the WWTP which fall into three groups: chemical, operational, and liquor mixture parameters.

*The collected sludge samples were fixed and treated by the FISH technique to make an identification of the genus *Gordonia* and thus perform a quantification of the filaments in the flocs by the subjective rate of Eikelboom. Once there were all the hybridizations and quantifications via the epifluorescence microscope observation, was carried out a statistical survey of exploratory character through the use of two statistical tools such as; the coefficient of correlation of Spearman and analysis of principal components (PCA). They were selected through preliminary exploratory analysis that parameters had greater significance against the population of *Gordonia*, these parameters were exposed in detail and compared with the existing studies in order to be able to extrapolate conclusions.*

*The findings are; the hybridizations made through the FISH technique corroborated the observations made using traditional microscopy, confirming that the observed *Mycolata* were of the genus *Gordonia*; nitrogen and phosphorus compounds have a very significant influence on the evolution of the genus *Gordonia* filaments; the temperature and content in oils and fats, has presented a very meaningful relationship with the population of *Gordonia*.*

Palabras clave:

Foaming, Gordonia, Bacterias Filamentosas, FISH, Depuración

Quiero aprovechar la oportunidad que estas líneas me otorgan para agradecer a las personas que me han ayudado en la realización de mi Tesina Final de Máster.

En primer lugar a mis directores Miguel Martín Monerris y José Luis Alonso, sin su paciencia (infinita), comprensión y consejos no habría podido llegar a concluir esta empresa.

En especial a José Luis por tener fe en mí, incluso cuando yo la perdía en mí mismo.

Gracias a los compañeros que trabajan en el departamento de Química y Microbiología del Agua que han hecho mi camino fácil y feliz.

A Inmaculada Amorós Muñoz por prestarme su ayuda en mil cosas y por su preocupación casi maternal.

A Andrés Zornoza Zornoza por soportar mis preguntas, acogerme en su casa y soportarme en general.

A Julián Fernandez Navarro por ser generoso con su tiempo y regalármelo.

A Mariela Reyes por arrojarme luz todos los días al entrar en nuestra pecera y como estrella que es, darme apoyo y calor.

A muchos otros con los que compartí momentos que son parte de nuestra historia y gracias a ellos han sido capítulos que merecen atesorar. Paula, Martas, Fabio, Liz, Yolanda... etc., etc.

A mis padres por soportarme, en muchos sentidos y en estos tiempos tan difíciles para todos.

A Bárbi por ser el bálsamo de cada día... y en ocasiones la cicuta. Pero siempre intentando hacerme mejor.

Y finalmente a los misteriosos senderos de la vida que me han llevado por vuestro lado.

Contenido

Contenido 2

Índice de figuras	5
Índice de tablas.....	9
1 Introducción	11
1.1 Espumas biológicas o Foaming.....	15
1.2 Hibridación <i>in situ</i> con sondas marcadas con fluoróforos “FISH”.....	17
2 Objetivos.....	19
3 Materiales y métodos.....	20
3.1 Muestreo	20
3.2 Técnica FISH.....	24
3.2.1 Sonda S-G-Gor-0596-a-A-22	24
3.2.2 Fijación y permeabilización de las muestras.....	26
3.2.3 Tratamiento de los portaobjetos FISH cubiertos con Teflón.....	26
3.2.4 Aplicación de las muestras a los portaobjetos FISH	26
3.2.5 Hibridación “in situ”	27
3.2.6 Reactivos para la realización de la técnica FISH	28
3.3 Observación de bacterias filamentosas y recogida de datos	33
3.3.1 Observación con microscopio de epifluorescencia	33
3.3.2 Estimación de <i>Gordonia spp.</i>	36
3.4 Imágenes tomadas de muestras hibridadas.....	38
3.5 Microscopía convencional versus FISH.....	40
3.6 Análisis estadístico.....	42
3.6.1 Coeficiente de Spearman	46
3.6.2 Análisis computacional. Coeficiente de correlación de Spearman.	47
3.6.3 Análisis de Componentes Principales (PCA)	47
3.6.4 Análisis computacional PCA.....	49
4 Resultados y discusión.....	54
4.1 Comparación de los resultados de las observaciones entre técnicas convencionales y FISH. 55	
4.2 Físico-Químicos.....	58
4.2.1 Coeficiente de Spearman. Físico-Químicos.	61
4.2.2 Análisis de componentes principales. Físico-Químicos	63
4.2.3 Compuestos del nitrógeno	65



4.2.4	Compuestos del fósforo	66
4.2.5	Aceites y grasas (AG)	67
4.2.6	Carbohidratos.....	68
4.2.7	Demanda Química de Oxígeno soluble (DQOs)	69
4.3	Licor de mezcla.....	70
4.3.1	Coeficiente de Spearman. Licor de mezcla.	71
4.3.2	Análisis de componentes principales. Licor de Mezcla.....	72
4.3.3	Temperatura (T)	76
4.3.4	Temperatura y Aceites y Grasas (AG). Dos parámetros en un solo mecanismo.....	77
4.3.5	Sólidos en Suspensión y Volátiles Licor de Mezcla (SSLM, SSVLM).....	78
4.3.6	Demanda Química de Oxígeno de Licor de Mezcla (DQOLM)	78
4.3.7	Conductividad.....	78
4.4	Variables operacionales	79
4.4.1	Coeficiente de Spearman. Variables operacionales.....	80
4.4.2	Análisis de componentes principales. Variables operacionales.....	80
4.4.3	Edad del fango.....	83
4.4.4	Tiempo de retención hidráulico (TRH)	83
4.4.5	Oxígeno disuelto (OD)	83
4.4.6	Carga másica (CM).....	84
5	Conclusiones.....	85
6	Trabajos citados	87
I	Anexo: Descripción de las instalaciones.....	I
I.I	EDAR Quart-Benàger:.....	I
I.II	EDAR Castelló de la Plana.....	II
II	Anexo: Valores empleados en el estudio	IV
II.I	Parámetros Físico-Químicos.....	IV
II.II	Parámetros del Licor de Mezcla	X
II.III	Parámetros Operacionales.....	XIII
III	Anexo: Gráficas	XIX
III.I	Variables Físico-Químicas.....	XIX
III.I.I	CN_orgs frente a FI Gordonia.....	XIX
III.I.II	CP_orgs frente a FI Gordonia	XX
III.I.III	AG frente a FI Gordonia	XXI
III.I.IV	Carbohidratos frente a FI Gordonia	XXII

III.I.V	Proteínas frente a FI Gordonia	XXIII
III.I.VI	CNTs frente a FI Gordonia	XXIV
III.I.VII	CP_PO4 frente a FI Gordonia.....	XXV
III.I.VIII	CPTs frente a FI Gordonia	XXVI
III.I.IX	CN_NH4 frente a FI Gordonia	XXVII
III.I.X	DBO5/NKT frente a FI Gordonia	XXVIII
III.I.XI	DBO/PT frente a FI Gordonia.....	XXIX
III.II	Variables Licor de Mezcla	XXX
III.II.I	SSLM frente a FI Gordonia.....	XXX
III.II.II	pH frente a FI Gordonia	XXXI
III.II.III	Conductividad frente a FI Gordonia	XXXII
III.II.IV	Temperatura frente a FI Gordonia	XXXIII
III.III	Variables operacionales.....	XXXIV
III.III.I	Oxígeno bajo frente a FI Gordonia	XXXIV
III.III.II	Oxígeno medio frente a FI Gordonia	XXXV
III.III.III	Oxígeno alto frente a FI Gordonia	XXXVI
III.III.IV	Oxígeno promedio en ppm frente a FI Gordonia	XXXVII
III.III.V	Tiempo de retención hidráulico frente a FI Gordonia	XXXVIII
III.III.VI	Edad de fango frente a FI Gordonia	XXXIX
III.III.VII	Carga másica	XL

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1 Árbol filogenético basado en la secuencia del gen 16S rDNA de <i>Gordonia</i> y otros actinomicetos representativos que presentan ácidos micólicos. (Arensköter, Bröker & Steinbüchel 2004)	14
Figura 1-2 Tinción de Gram en la que se aprecia la complejidad estructural de un flóculo con bacterias filamentosas ramificadas del grupo mycolata teñidas de color azul. 1000X. .	16
Figura 3-1 Porta con 10 pocillos multi-muestra.	23
Figura 3-2 Longitud de onda de absorción y emisión de la rodamina.	25
Figura 3-3 Estructura de la rodamina, 5'-Carboxitetrametilrodamina (TAMRA)	25
Figura 3-4 Material empleado para la realización de la técnica FISH.	28
Figura 3-5 Sala de microscopía y microscopio de epifluorescencia Olympus BX 50.	33
Figura 3-6 Esquema de funcionamiento del microscopio de epifluorescencia.	33
Figura 3-7 Microscopio de epifluorescencia con sus principales componentes.	34
Figura 3-8 Espectro de absorción y emisión de 5'-Carboxitetrametilrodamina.....	35
Figura 3-9 Formulario para la observación y cuantificación.	37
Figura 3-10 Muestra hibridada de <i>Gordonia</i> en la que se aprecia la hibridación, 1000X.....	39
Figura 3-11 Imagen tomada con cámara compacta (Canon Ixus 620) directamente del ocular.	39
Figura 3-12 Muestra hibridada de <i>Gordonia</i> en la que se aprecia la hibridación, 1000X.....	39
Figura 3-13 Muestra hibridada de <i>Gordonia</i> en la que se aprecia la hibridación, 1000X.....	39
Figura 3-14 Muestra hibridada de <i>Gordonia</i> en la que se aprecia la hibridación, 1000X.....	39
Figura 3-15 Muestra hibridada de <i>Gordonia</i> en la que se aprecia la hibridación, 1000X.....	39
Figura 3-16 Esquema de la matriz de datos.	43
Figura 4-1 Comparativa entre los resultados mediante FISH y técnicas convencionales. Quart-Benager.	56
Figura 4-2 Comparativa entre los resultados mediante FISH y técnicas convencionales. Castellón Línea1.	56
Figura 4-3 Comparativa entre los resultados mediante FISH y técnicas convencionales. Castellón Línea 2.	57
Figura 4-4 Gráfico de componentes en espacio rotado. Físico-Químicos.....	65
Figura 4-5 Gráfico de las tres componentes en espacio rotado. Licor de mezcla.....	74
Figura 4-6 Gráfico de componentes en espacio rotado. Licor de mezcla. Componentes 1 y 2.	74
Figura 4-7 Gráfico de componentes en espacio rotado. Licor de mezcla. Componentes 1 y 3.	75

Figura 4-8 Gráfico de componentes en espacio rotado. Variables operacionales.	82
Figura 6-1 Vista aérea de la depuradora Quart-Benàger.....	I
Figura 6-2 Emplazamiento de la EDAR Quart-Benàger.....	I
Figura 6-3 Esquema de tratamiento de la EDAR Quart-Benager.....	II
Figura 6-4 EDAR Castelló de la Plana.	III
Figura 6-5 Emplazamiento de la EDAR de Castelló de la Plana.	III
Figura 6-6 Esquema de tratamiento de la EDAR Castelló de la Plana.	III
Figura 6-7 Carga de Nitrógeno Orgánico Soluble (CN orgs), nivel de Gordonia. Quart-Benager.	XIX
Figura 6-8 Carga de Nitrógeno Orgánico Soluble (CN orgs), nivel de Gordonia. Castellón L1.	XIX
Figura 6-9 Carga de Nitrógeno Orgánico Soluble (CN orgs), nivel de Gordonia. Castellón L2.	XIX
Figura 6-10 Carga de Fósforo Orgánico Soluble (CP orgs), nivel de Gordonia. Quart-Benager.	XX
Figura 6-11 Carga de Fósforo Orgánico Soluble (CP orgs), nivel de Gordonia. Castellón L1. ...	XX
Figura 6-12 Carga de Fósforo Orgánico Soluble (CP orgs), nivel de Gordonia. Castellón L2. ...	XX
Figura 6-13 Aceites y Grasas (AG), nivel de Gordonia. Quart-Benager.	XXI
Figura 6-14 Aceites y Grasas (AG), nivel de Gordonia. Castellón L1.....	XXI
Figura 6-15 Aceites y Grasas (AG), nivel de Gordonia. Castellón L2.....	XXI
Figura 6-16 Carbohidratos (CARBO), nivel de Gordonia. Quart-Benager.....	XXII
Figura 6-17 Carbohidratos (CARBO), nivel de Gordonia. Castellón L1.	XXII
Figura 6-18 Carbohidratos (CARBO), nivel de Gordonia. Castellón L2.	XXII
Figura 6-19 Proteínas (PROTE), nivel de Gordonia. Quart-Benager.	XXIII
Figura 6-20 Proteínas (PROTE), nivel de Gordonia. Castellón L1.....	XXIII
Figura 6-21 Proteínas (PROTE), nivel de Gordonia. Castellón L2.....	XXIII
Figura 6-22 Carga de Nitrógeno Total soluble (CNTs), nivel de Gordonia. Quart-Benager..	XXIV
Figura 6-23 Carga de Nitrógeno Total soluble (CNTs), nivel de Gordonia. Castellón L1.	XXIV
Figura 6-24 Carga de Nitrógeno Total soluble (CNTs), nivel de Gordonia. Castellón L2.	XXIV
Figura 6-25 Carga de Fósforo-fosfatos (CP PO4), nivel de Gordonia. Quart-Benager.....	XXV
Figura 6-26 Carga de Fósforo-fosfatos (CP PO4), nivel de Gordonia. Castellón L1.	XXV
Figura 6-27 Carga de Fósforo-fosfatos (CP PO4), nivel de Gordonia. Castellón L2.	XXV
Figura 6-28 Carga de Fósforo Total soluble (CPTs), nivel de Gordonia. Quart-Benager.	XXVI
Figura 6-29 Carga de Fósforo Total soluble (CPTs), nivel de Gordonia. Castellón L1.	XXVI
Figura 6-30 Carga de Fósforo Total soluble (CPTs), nivel de Gordonia. Castellón L2.	XXVI



Figura 6-31 Carga de Nitrógeno amoniacal (CN NH ₄), nivel de Gordonia. Quart-Benager.	XXVII
Figura 6-32 Carga de Nitrógeno amoniacal (CN NH ₄), nivel de Gordonia. Castellón L1.....	XXVII
Figura 6-33 Carga de Nitrógeno amoniacal (CN NH ₄), nivel de Gordonia. Castellón L2.....	XXVII
Figura 6-34 Relación DBO ₅ /NKT, nivel de Gordonia. Quart-Benager.	XXVIII
Figura 6-35 Relación DBO ₅ /NKT, nivel de Gordonia. Castellón L1.....	XXVIII
Figura 6-36 Relación DBO ₅ /NKT, nivel de Gordonia. Castellón L2.....	XXVIII
Figura 6-37 Relación DBO ₅ /PT, nivel de Gordonia. Quart-Benager.....	XXIX
Figura 6-38 Relación DBO ₅ /PT, nivel de Gordonia. Castellón L1.	XXIX
Figura 6-39 Relación DBO ₅ /PT, nivel de Gordonia. Castellón L2.	XXIX
Figura 6-40 Sólidos en Suspensión Licor de Mezcla (SSLM), nivel de Gordonia. Quart-Benager.	XXX
Figura 6-41 Sólidos en Suspensión Licor de Mezcla (SSLM), nivel de Gordonia. Castellón L1.	XXX
Figura 6-42 Sólidos en Suspensión Licor de Mezcla (SSLM), nivel de Gordonia. Castellón L2.	XXX
Figura 6-43 pH, nivel de Gordonia. Quart-Benager.....	XXXI
Figura 6-44 pH, nivel de Gordonia. Castellón L1.	XXXI
Figura 6-45 pH, nivel de Gordonia. Castellón L2.	XXXI
Figura 6-46 Conductividad, nivel de Gordonia. Quart-Benager.	XXXII
Figura 6-47 Conductividad, nivel de Gordonia. Castellón L1.	XXXII
Figura 6-48 Conductividad, nivel de Gordonia. Castellón L2.	XXXII
Figura 6-49 Temperatura, nivel de Gordonia. Quart-Benager.	XXXIII
Figura 6-50 Temperatura, nivel de Gordonia. Castellón L1.	XXXIII
Figura 6-51 Temperatura, nivel de Gordonia. Castellón L2.	XXXIII
Figura 6-52 Oxígeno bajo, nivel de Gordonia. Quart-Benager.....	XXXIV
Figura 6-53 Oxígeno bajo, nivel de Gordonia. Castellón L1.	XXXIV
Figura 6-54 Oxígeno bajo, nivel de Gordonia. Castellón L2.	XXXIV
Figura 6-55 Oxígeno medio, nivel de Gordonia. Quart-Benager.....	XXXV
Figura 6-56 Oxígeno medio, nivel de Gordonia. Castellón L1.	XXXV
Figura 6-57 Oxígeno medio, nivel de Gordonia. Castellón L2.	XXXV
Figura 6-58 Oxígeno alto, nivel de Gordonia. Quart-Benager.....	XXXVI
Figura 6-59 Oxígeno alto, nivel de Gordonia. Castellón L1.	XXXVI
Figura 6-60 Oxígeno alto, nivel de Gordonia. Castellón L2.	XXXVI
Figura 6-61 Promedio de Oxígeno (ppm), nivel de Gordonia. Quart-Benager.	XXXVII
Figura 6-62 Promedio de Oxígeno (ppm), nivel de Gordonia. Castellón L1.	XXXVII

Figura 6-63 Promedio de Oxígeno (ppm), nivel de Gordonía. Castellón L2.XXXVII

Figura 6-64 Tiempo de Retención Hidráulico (TRH), nivel de Gordonía. Quart-Benager. XXXVIII

Figura 6-65 Tiempo de Retención Hidráulico (TRH), nivel de Gordonía. Castellón L1.XXXVIII

Figura 6-66 Tiempo de Retención Hidráulico (TRH), nivel de Gordonía. Castellón L2.XXXVIII

Figura 6-67 Edad de Fango (EF), nivel de Gordonía. Quart-Benager..... XXXIX

Figura 6-68 Edad de Fango (EF), nivel de Gordonía. Castellón L1. XXXIX

Figura 6-69 Edad de Fango (EF), nivel de Gordonía. Castellón L2. XXXIX

Figura 6-70 Carga Másica (CM), nivel de Gordonía. Quart-Benager.XL

Figura 6-71 Carga Másica (CM), nivel de Gordonía. Castellón L1.....XL

Figura 6-72 Carga Másica (CM), nivel de Gordonía. Castellón L2.....XL



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1 Quimiotaxonómia bacteriana según el tipo de membrana celular.....	13
Tabla 3-1 Esquema de la campaña de muestreo.	20
Tabla 3-2 Parámetros físico-químicos y biológicos determinados en el afluente al reactor y efluente del decantador secundario.....	21
Tabla 3-3 Parámetros físico-químicos determinados en el licor mezcla.....	22
Tabla 3-4 Muestras y fechas de toma.	22
Tabla 3-5 Compuestos del tampón de hibridación	31
Tabla 3-6 Volumen de reactivos de hibridación en función del porcentaje de formamida empleado	31
Tabla 3-7 Volumen de reactivos de lavado según el porcentaje de formamida empleado. ...	32
Tabla 3-8 Escala del Índice subjetivo de Eikelboom (IF).....	36
Tabla 3-9 Valores de IVFD en las EDAR.....	41
Tabla 3-10 Variables físico-químicas	42
Tabla 3-11 Variables del licor mezcla	43
Tabla 3-12 Variables operacionales.....	43
Tabla 3-13 Fechas de muestreo de Quart- Benager.....	45
Tabla 3-14 Muestreos en líneas 1 y 2 de Castellón.....	46
Tabla 3-15 Media de adecuación muestral Kaiser-Meyer-Olkin.....	49
Tabla 4-1 Comparativa entre observaciones realizadas con FISH y mediante técnicas convencionales. Quart-Benager.....	55
Tabla 4-2 Comparativa entre observaciones realizadas con FISH y mediante técnicas convencionales. Castellón Línea 1.	56
Tabla 4-3 Comparativa entre observaciones realizadas con FISH y mediante técnicas convencionales. Castellón Línea 2.	57
Tabla 4-4 Parámetros Físico-Químicos de Quart-Benager	58
Tabla 4-5 Parámetros Físico-Químicos Castellón línea 1	59
Tabla 4-6 Parámetros Físico-Químicos Castellón línea 2	60
Tabla 4-7 Coeficientes de Spearman para variables Físico-Químicas	61
Tabla 4-8 KMO y prueba de Bartlett.....	63
Tabla 4-9 Varianza total explicada. Físico-químicas	63
Tabla 4-10 Matriz de componentes rotados	64
Tabla 4-11 Valores de licor de mezcla Quart-Benager	70

Tabla 4-12 Valores licor de mezcla Castellón línea 1	70
Tabla 4-13 Valores licor de mezcla Castellón línea 2	70
Tabla 4-14 Coeficientes de Spearman para variables del licor de mezcla.....	71
Tabla 4-15 KMO y prueba de Bartlett del licor de mezcla	72
Tabla 4-16 Varianza total explicada. Licor de mezcla	72
Tabla 4-17 Matriz de componentes rotados licor de mezcla	73
Tabla 4-18 Variables operacionales Quart-Benager	79
Tabla 4-19 Variables operacionales Castellón 1	79
Tabla 4-20 Variables operacionales Castellón 2	79
Tabla 4-21 Coeficientes de Spearman para variables operacionales	80
Tabla 4-22 KMO y prueba de Bartlett	80
Tabla 4-23 Varianza total explicada. Variables operacionales	81
Tabla 4-24 Matriz de componentes rotados.....	81
Tabla II-1 Parámetros Físico-Químicos de Quart-Benager	IV
Tabla II-2 Parámetros Físico-Químicos Castellón línea 1	VI
Tabla II-3 Parámetros Físico-Químicos Castellón línea 2	VIII
Tabla II-4 Valores de licor de mezcla Quart-Benager	X
Tabla II-5 Valores licor de mezcla Castellón línea 1	XI
Tabla II-6 Valores licor de mezcla Castellón línea 2	XII
Tabla II-7 Variables operacionales Quart-Benager	XIII
Tabla II-8 Variables operacionales Castellón 1	XIV
Tabla II-9 Variables operacionales Castellón 2	XVI



1 Introducció

La depuració de aigües residuals hoy en dia representa una necessitat para dar solució al problema de gestionar los residuos, que de otra manera, al ser vertidos al medio representarían una amenaza para los ecosistemas naturales y por ende al propio ser humano.

El estado del arte a este respecto ha logrado desarrollar tecnologías que van más allá de la simple eliminación de sólidos y materia orgánica del agua vertida. Para ser una rama de la ciencia/técnica que lleva entre nosotros desde el siglo XIX (y anteriormente si se consideran las canalizaciones de saneamiento romanas) se ha conseguido un gran avance. Ya en la segunda mitad siglo XIX con el desarrollo de la teoría del germen a cargo de Koch y Pasteur marcó el inicio de una nueva era en el campo del saneamiento (Metcalf & Eddy, INC. 2000).

Europa por tratarse de un territorio más densamente poblado se enfrentaba a problemas que en el Nuevo Mundo carecían de importancia. La contaminación de los cauces fluviales y de las masas de agua, profería en la población de las urbes superpobladas problemas de sanitarios de proporciones epidémicas

Hoy en día, disponemos de un amplísimo abanico que permite tratar las aguas residuales hasta convertirlas, si es preciso, incluso en agua potable. Las operaciones unitarias que forman parte de las instalaciones de tratamiento de aguas residuales son aquellos métodos de tratamiento en los que predominan los fenómenos físicos, mientras que aquellos métodos en los que la eliminación de los contaminantes se realiza en base a procesos químicos o biológicos se conocen como procesos unitarios. Estas operaciones y procesos se agrupan entre sí para constituir los así llamados tratamiento primario, secundario y terciario (Metcalf & Eddy, INC. 2000).

El diseño de las instalaciones de aguas residuales tiene en su empeño aunar dichas operaciones y procesos con el fin de dar soluciones a los problemas de vertido de aguas residuales ya sea de carácter industrial o urbano. Y se hace imprescindible un estudio muy complejo de dichas instalaciones, tanto en la fase de diseño, como en la de puesta en marcha y funcionamiento para que todas las partes funcionen como una cumplan su propósito independientemente de las condiciones cambiantes. Desafortunadamente, las plantas depuradoras se asemejan más a organismos vivos que a maquinas sin más.

Obviamente, su funcionamiento se ve regulado por un intrincado sistema de relaciones entre microorganismos que componen los llamados fangos activos y que no es otra cosa que un complejo ecosistema en el que los microorganismos compiten en su afán de proliferar.

Nuestro cometido es que reine la paz en ese micro mundo.

Esto no siempre se ve favorecido por las cambiantes condiciones del afluente a la planta, fuente de una diversidad tan grande de sustancias que altera ese ecosistema deseado.

Como en cualquier ecosistema, el desequilibrio en la población de una especie tiene consecuencias sobre otras que inmediatamente competirán por ocupar el nicho ecológico que ha dejado la anterior.

Ese es el quid de nuestro problema, el desequilibrio del ecosistema y la proliferación de un género bacteriano (género *Gordonia*) que impulsado por las circunstancias favorables se ve catapultado a un desarrollo explosivo y a la generación de problemas operacionales en las plantas.

No queremos en este trabajo señalar al género *Gordonia* como el único causante de la formación de espumas de origen biológico “foaming”, pero “toda piedra hace pared” y precisamente entender el tamaño de esa piedra es el objetivo de este estudio. Y sobre todo, cuales son las causas que generan la proliferación de *Gordonia spp.*

Clasificación taxonómica del género *Gordonia*:

- Dominio: *Bacteria*
- Phylum: *Actinobacteria*
- Clase: *Actinobacteria*
- Subclase: *Actinobacteriae*
- Orden: *Actinomicetales*
- Suborden: *Corinebacterineae*
- Familia: *Gordoniaceae*
- Género: *Gordonia*

(Klatte 1994)

El género *Gordonia* dentro del grupo de los Mycolata, es el más frecuentemente implicado en problemas de foaming como hemos citado anteriormente.

En la bibliografía encontramos constantes referencias a su implicación en dichos episodios de foaming a lo largo de todo el mundo, pese a que presenta mayor incidencia en el continente Europeo (Oerther et al. 2001; Wagner & Loy 2002).

Las características específicas de dichas bacterias son:

- Pequeños bacilos y formas cocáceas.
- Pueden formar hifas con ramificaciones en ángulo recto.
- Aerobios estrictos.
- Gram + o Gram variable. Dan resultado como Gram – siendo que en realidad son Gram + cuando se encuentran en situaciones de estrés celular.
- Catalasa +.
- Parcialmente acido-alcohol resistente.
- Pared celular ácido meso-diaminopiméico (DAP)
- Azúcares mayoritarios son galactosa y arabinosa. Quimiotipo de pared celular IV. Según puede verse en la tabla 1-1.
- Ácidos micólicos de 48-66 átomos de carbono.

(Arensköter, Bröker & Steinbüchel 2004)

Se consideran como patógenos oportunistas aislado de esputos en pacientes con infecciones pulmonares como *G. sputi* y *G. bronchialis* (Tsukamura 1982). Las Nocardioformes suelen crecer a temperaturas superiores a 30°C. Y las cepas de *Gordonia* tardan alrededor de dos semanas en crecer.

Los métodos clásicos de identificación y caracterización son:

- Fisiológicos (Metabolismo oxidativo o fermentativo)
- Morfológicos
- Quimiotaxonómicos

Tabla 1-1 Quimiotaxonómia bacteriana según el tipo de membrana celular.

Tipo de pared	Constituyentes mayoritarios	Generos
I	L-DAP, glicina	Streptomyces
II	Meso-DAP, glicina	Micromonospora
III	Meso-DAP	Actinomadura
IV	Meso-DAP, arabinosa, galactosa	Nocardia, Gordonia, Saccharopolyspora
V	Lisina, ornitina	Actinomyces
VI	Ácido aspártico, galactosa	Oerskovia
VII	DAB, glicina	Agromyces
VIII	Ornitina	Cellulomonas

Lamentablemente, la identificación por métodos clásicos presenta muchas lagunas ya que como se ha podido observar en innumerables ocasiones, las bacterias presentan morfología diferenciada según sea su estadio de desarrollo (van der Waarde et al. 2002).

No se trata de una tarea sencilla la identificación bacteriana, simplemente el género *Gordonia* incluye más de 20 especies diferentes (Ver figura 1-1) y cada una con sus características morfológicas y metabólicas específicas. Además, *Gordonia*, no es el único género que presenta bacterias filamentosas y si esto no fuera bastante, durante el desarrollo de las bacterias de una misma especie, modifican su morfología de manera que es muy complicado poder identificar mediante las tinciones tradicionales.

Así pues, se han desarrollado técnicas con las que se puede identificar con mayor certeza los microorganismos independientemente de que presenten morfologías poco habituales. Dichos métodos se centran en el material genético, el cual es un identificador mucho más preciso de qué tipo de organismo tenemos presente. En nuestro caso el ARN ribosómico será la diana de las hibridaciones con sondas fluorescentes que realizaremos con las sondas específicamente diseñadas a tal fin.

Todo ello se desarrollará de manera detallada en el apartado 3.3.1.

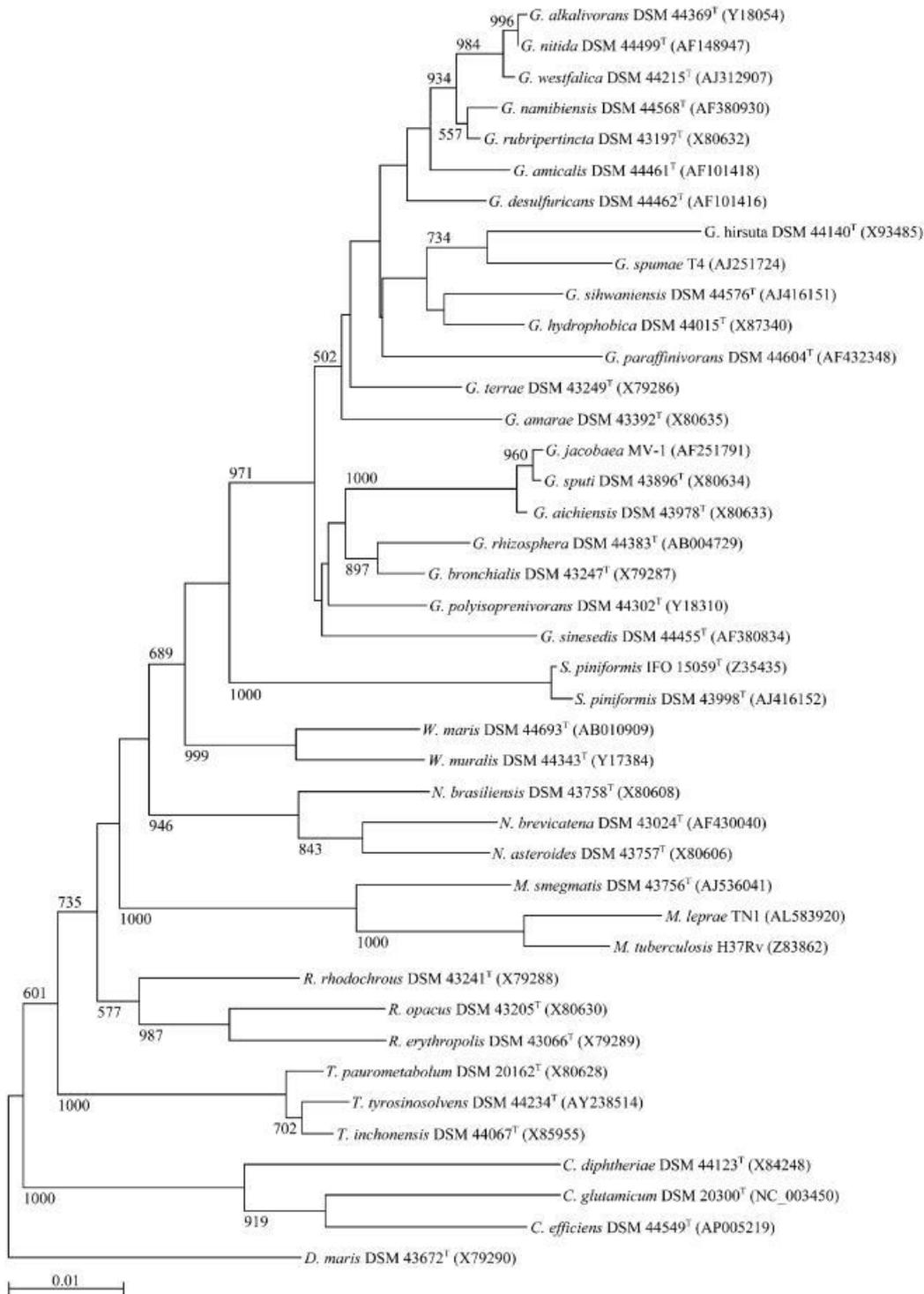


Figura 1-1 Árbol filogenético basado en la secuencia del gen 16S rDNA de *Gordonia* y otros actinomicetos representativos que presentan ácidos micólicos. (Arensköter, Bröker & Steinbüchel 2004)

1.1 Espumas biológicas o Foaming

El foaming o espumas biológicas en tratamiento de aguas residuales por fangos activos puede describirse como la formación de una capa de espuma en la superficie de los reactores aireados o decantadores secundarios (clarificadores) debido a la proliferación excesiva de bacterias filamentosas hidrofóbicas (Jenkins, Richard & Daigger 2003; Soddell 1999) y posiblemente microorganismos no filamentosos (Davenport & Curtis 2002; Klein 2003; Soddell 1999). Este problema está ampliamente extendido por todo el mundo, alrededor del 20-60% de las plantas depuradoras de aguas residuales experimentan episodios de foaming ocasionales (Pitt & Jenkins 1990; Pujol et al. 1991; Seviour et al. 1994; Klein 2003; Frigon et al. 2006).

Cuando se habla de foaming, no nos referimos a las espumas generadas por un solo tipo de bacteria. La formación del foaming depende de un nutrido grupo de agentes, que no solo son biológicos, sino también relativos a las características operacionales de la planta, de las características físico-químicas del afluente y de otros factores ambientales. Evidentemente cierto tipo de bacterias favorecen la formación de espumas ya que las características químicas de sus paredes celulares facilitan la emulsión del fango, principalmente por tratarse de membranas celulares de características hidrofóbicas. Entre las bacterias que presentan esta característica se encuentra un amplio grupo de bacterias englobadas dentro del grupo Mycolata. Las bacterias de dicho grupo presentan ácidos micólicos en la superficie de su membrana que les confieren propiedades hidrófobas.

La estabilidad del flóculo en el fango activo es mejorada por partículas sólidas, las cuales se vuelven hidrofóbicas por los filamentos que tienen paredes celulares hidrofóbicas, generando una espuma trifásica. Estas partículas deben ser pequeñas (menos de 300 μm) de manera que puedan ser elevadas por la flotabilidad de las burbujas (Soddell & Seviour 1990). Las partículas hidrofóbicas pueden además generar un puente entre dos burbujas de aire y crear una presa que impide el drenaje del líquido. De esta manera las espumas se vuelven estables. Por lo tanto, para la formación de una espuma estable, son varios los factores que tienen que estar presentes: las burbujas de aire, partículas hidrofóbicas y tensioactivos¹.

En la formación del foaming actúan predominantemente bacterias Gram +.

Los problemas que generan las espumas, entre otros son:

- Mantenimiento extra de la limpieza por el operador de la planta.
- Bloqueo de sistemas de eliminación de espumas.
- Reducción de la aireación superficial en tanques con aireación mecánica.
- Arrastre y posible dispersión de patógenos por acción del viento.
- Descomposición de espumas causando malos olores y suciedad.
- Reducción de la calidad del efluente generando un aumento de los sólidos en suspensión y de la DBO si las espumas alcanzan la salida.

¹ También llamados surfactantes o emulsionantes.

- En sistemas alimentados por oxígeno puro, las espumas pueden alcanzar los compresores y producirse fuego (de los Reyes 2010; Seviour & Nielsen 2010; Blackall 1986).
- Pueden retener más del 40% de sólidos en suspensión (SS), con lo que no son eliminados.
- Problemas de aireación ya que las espumas se interponen entre la interfase agua-aire con lo que pueden producir circunstancias de anoxia.
- En climas fríos las espumas pueden llegar a congelarse.
- Posibles problemas de foaming en digestores anaerobios si llegan a ellos (Seviour & Blackall 1988).

El rol de las bacterias filamentosas en la formación del flóculo es fundamental ya que aporta consistencia al flóculo e impide que se rompa por el efecto de fuerzas mecánicas durante su trasiego por las diferentes unidades de las estaciones depuradoras.

En la figura 1-2 se aprecia de que manera las bacterias filamentosas atraviesan el flóculo confiriéndole una estructura más estable al tejer una red.

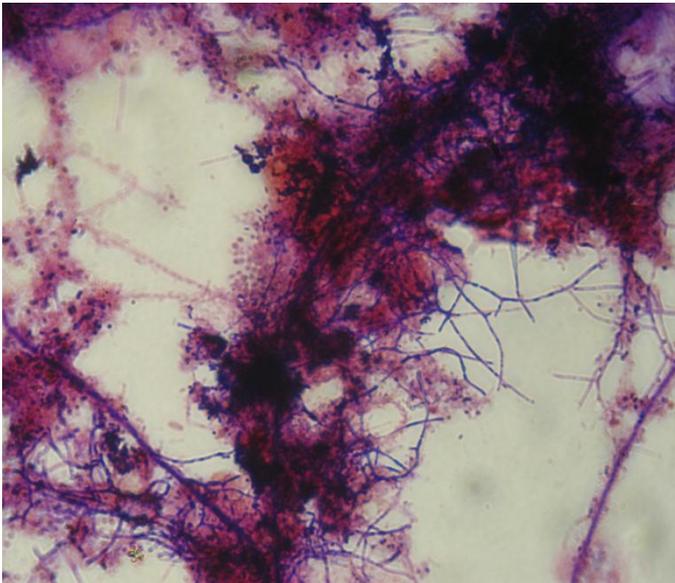


Figura 1-2 Tinción de Gram en la que se aprecia la complejidad estructural de un flóculo con bacterias filamentosas ramificadas del grupo mycolata teñidas de color azul. 1000X.

Existen autores que atribuyen directamente a la presencia de biomasa de *Gordonia* la existencia de espumas biológicas en las depuradoras (de los Reyes III & Raskin 2002).

Pero *Gordonia* es un género que engloba a un nutrido grupo de bacterias. La importancia del género *Gordonia* ha sido revisada recientemente (Arensköter, Bröker & Steinbüchel 2004). En este trabajo se pone de manifiesto la gran diversidad metabólica y las posibles aplicaciones en biotecnología y biorremediación de este género. Desde el punto de vista clínico está empezando a ser estudiado ya que además de las especies consideradas como patógenas oportunistas, *G. bronchialis* y *G. sputi* (McNeil & Brown 1994), otras especies ambientales como *G. terrae* han sido relacionadas con cuadros clínicos (Pham et al. 2003).

Algo que a priori favorece la formación de flóculos mayores, a su vez y cuando se da en exceso, impide la sedimentación del fango y la aparición de espumas por quedar las burbujas de aire proporcionados por los difusores en los digestores biológicos atrapadas en su red.

Los factores que favorecen el crecimiento de las bacterias filamentosas son:

- Largo TRC (Tiempo de Retención Celular o $\theta \uparrow$).
- Carga másica elevada (F/M \uparrow)
- Sólidos en Suspensión elevados en el licor de mezcla. (MLSS \uparrow)
- Relación oil/greasse aceites/grasas elevada. Es decir que la mayor parte de las grasas estén en forma de aceites, con lo que se produce la emulsión de las mismas.
- Presencia de aguas industriales.
- Corto tiempo de retención celular (TRC \downarrow).
- Que genera baja carga másica (F/M \downarrow).
- Déficit de nutrientes.
- Temperatura baja (T \downarrow).
- Baja concentración de oxígeno disuelto en el reactor (OD \downarrow).
- Flujo reducido.

(de los Reyes 2010; Seviour & Nielsen 2010)

De estas condiciones generales que se han estudiado para las bacterias filamentosas, vamos a intentar concretar con nuestro estudio cuales han sido los condicionantes que han generado el crecimiento o la desaparición de la población de *Gordonia*.

1.2 Hibridación *in situ* con sondas marcadas con fluoróforos “FISH”.

El rol de la técnica FISH nace de la necesidad de identificar entre los diferentes tipos de bacterias, que mediante el reconocimiento morfológico y con tinciones (como desarrollo Eikelboom 1975, 1977) no son suficientes, ya que la morfología puede verse alterada por las condiciones ambientales a las que están sometidas las bacterias ramificadas y además porque pueden pertenecer a género diferentes, con características metabólicas y de crecimiento variables.

Precisamente el método de Eikelboom no es capaz de distinguir entre los diferentes géneros de bacterias dentro de una familia (por ejemplo las del grupo mycolata).

Los problemas de reconocimiento se deben a:

- Condiciones ambientales que modifican la morfología de las cadenas bacterianas.
- La fase de crecimiento en la que se encuentren. Esto modifica la longitud de las cadenas.

El empleo de la técnica FISH ha dado a la luz una serie de importantes conclusiones.

- 1.- Células que no presentan la típica morfología de ramificación en ángulo recto de los actinomicetos nocardioformes, han dado positivo en la detección de actinomicetos.

Algunas formas no filamentosas de *Gordonia* y *Rhodococcus* han sido detectados y se muestran en mayor número con lo que son más importantes que aquellas que se presentan en forma filamentosas.

- 2.- La morfología de *Gordonia* cambia a medida que el proceso de foaming progresa (de los Reyes y Raskin, 2002).
- 3.- La técnica FISH muestra que las células presentan fluorescencia con desigual intensidad, y algunas células en el mismo filamento pueden no presentar ninguna señal de hibridación (Carr, Eales & Seviour 2006; de los Reyes, Ritter & Raskin 1997; de los Reyes III & Raskin 2002; Schuppler et al. 1998), debido a que las células estaban muertas o con una baja actividad metabólica y por tanto con un bajo contenido en ribosomas (por debajo de 1000/célula).
- 4.- La técnica FISH ha mostrado (de los Reyes et al., 1998) un incremento de la masa de *Gordonia* de un 4% a un 32% en MLVSS, Mixed Liquor Volatile Suspended Solids Concentration (Concentración de Sólidos Suspendidos Volátiles en el Licor de Mezcla) en episodios de foaming. Cuando el foaming desaparece, los niveles de rRNA de *Gordonia* y de biomasa decrecen.
- 5.- La técnica FISH mediante estudios cuantitativos ha mostrado dos umbrales referidos a la longitud de los filamentos que componen las espumas (de los Reyes III & Raskin 2002).
 - a. El primer umbral es de formación el cual puede ser determinado por el súbito aumento en el potencial de foaming. $2 \cdot 10^8 \mu\text{m/ml}$.
 - b. El segundo umbral es el llamado “umbral de estabilidad” el cual corresponde a la situación en la que se mantiene una capa gruesa y viscosa en el tanque de aireación. $1 \cdot 10^9 \mu\text{m/ml}$.

Se ha llegado a la hipótesis de que una planta con el umbral de formación por debajo de $2 \cdot 10^8 \mu\text{m/ml}$ puede experimentar la formación de foaming. Mientras que las plantas que presentan durante todo el año foaming, presentan un umbral de estabilidad por debajo de $1 \cdot 10^9 \mu\text{m/ml}$.

Esto sugiere que los umbrales van ligados a los tratamientos específicos de cada planta (Reyes 2010).



2 Objetivos

El objetivo general de este trabajo es la identificación y cuantificación de las bacterias del género *Gordonia* en los fangos de 2 EDAR de la Comunidad Valenciana y estudiar sus relaciones con los parámetros físico-químicos, y operacionales.

Los objetivos específicos en los que se va a centrar este trabajo son:

- Aplicación de la técnica FISH a muestras obtenidas en 2 EDAR de la Comunidad Valenciana (Quart-Benager y Castellón) para la detección de bacterias del género *Gordonia*.
- Determinar mediante el índice subjetivo de Eikelbomm (IF) la abundancia de filamentos del género *Gordonia* en las muestras de fango activo real.
- Estudiar las relaciones existentes entre los parámetros operacionales, físico-químicos y del licor de mezcla de las EDAR, y la abundancia de bacterias filamentosas del género *Gordonia*.
- Indicar que parámetros operacionales y físico-químicos son los causantes de la aparición o desaparición de las bacterias filamentosas, e indicar las mejores prácticas para evitarlas.

3 Materiales y métodos.

3.1 Muestreo

La toma de muestras se llevaron a cabo en el afluente, efluente y los reactores biológicos de 2 EDAR, la de Quart-Benàger y la de Castellò de la Plana² en el periodo comprendido entre diciembre del 2008 y enero del 2010.

Los datos que disponemos de ambas plantas son:

- Las variables operacionales de la planta.
- Los valores físico-químicos.
- Y los datos del licor de mezcla.

La frecuencia de muestreo se realizó cada 15 días y se estructuró cada campaña de muestreo como se muestra en la tabla 3-1.

Tabla 3-1 Esquema de la campaña de muestreo.

Día	1	2	3	4
Muestra	Afluente al reactor		Afluente al reactor y efluente decantador secundario	Licor de Mezcla
Tipo de muestra	Compuesta (horaria)			Simple (puntual)

Como se puede ver en la citada tabla, los primeros tres días se muestreo el afluente al reactor y se tomó una muestra del efluente del decantador secundario el tercer día. En este caso las muestras que se tomaron fueron horarias y mezclaron con las demás ponderando su peso en función del caudal de entrada a la planta para cada hora. Para finalizar, cuarto día se tomó una muestra del licor de mezcla del reactor.

En el caso de la muestra del licor de mezcla, esta muestra fue tomada de una manera simple, es decir, se tomó una medición puntual el día señalado.

En cuanto a los parámetros físico-químicos y biológicos que se analizaron se recogen en la tabla 3-2 y tabla 3-3 y como se puede apreciar los días 1 y 2 de muestreo se analizaron los niveles de DQO, DQO soluble (DQO_s) y DBO₅. El día 3 de la campaña de muestreo se realizó un análisis completo del afluente y del efluente.

² La descripción de las instalaciones se recoge en el apartado de Anexos I.

Tabla 3-2 Parámetros físico-químicos y biológicos determinados en el afluente al reactor y efluente del decantador secundario.

Parámetros	Abreviatura	Ud	Afl. reactor		Efl. dec. secundario
			Día 1,2	Día 3	Día 3
pH	-	Ud.	-	x	-
Conductividad	-	μS/cm	-	x	-
Sólidos en Suspensión Totales	SST	mg/L	-	x	x
Sólidos en Suspensión Volátiles Totales	SSVT	mg/L	-	x	x
Demanda Química de Oxígeno	DQO	mg/L	x	x	x
Demanda Química de Oxígeno soluble	DQOs	mg/L	x	x	x
Demanda Química de Oxígeno particulada suspendida	DQOps	mg/L	-	x	x
Demanda Química de Oxígeno particulada coloidal	DQOpc	mg/L	-	x	x
Demanda Bioquímica de Oxígeno a 5 días	DBO ₅	mg/L	x	x	x
Demanda Bioquímica de Oxígeno filtrada a 5 días	DBO ₅ f	mg/L	-	x	x
Demanda Bioquímica de Oxígeno particulada 5 días	DBO ₅ p	mg/L	-	x	x
Nitrógeno total	NT	mg/L	-	-	x
Nitrógeno total soluble	NTs	mg/L	-	-	x
Nitrógeno Kjeldhal Total	NKT	mg/L	-	x	x
Nitrógeno Kjeldhal Total soluble	NKTs	mg/L	-	x	x
Nitrógeno orgánico soluble	N-orgs	mg/L	-	x	x
Nitrógeno orgánico particulado	N-orgp	mg/L	-	x	x
Nitrógeno amoniacal	N-NH ₄ ⁺	mg/L	-	x	x
Nitrógeno nítrico	N-NO ₃ ⁻	mg/L	-	-	x
Nitrógeno nítrico	N-NO ₂ ⁻	mg/L	-	-	x
Fósforo total	PT	mg/L	-	x	x
Fósforo total soluble	PTs	mg/L	-	x	x
Fósforo orgánico soluble	P-orgs	mg/L	-	x	x
Fósforo orgánico particulado	P-orgp	mg/L	-	x	x
Fósforo del ortofosfato	P-PO ₄ ³⁻	mg/L	-	x	x
Tensioactivos aniónicos	TA	mg/L	-	x	x
Níquel (mg/L)	-	mg/L	-	-	x
Zinc (mg/L)	-	mg/L	-	-	x
Fenoles (mg/L)	-	mg/L	-	-	x
Sulfatos (mg/L)	-	mg/L	-	-	x
Cloruros (mg/L)	-	mg/L	-	-	x

Tabla 3-3 Parámetros físico-químicos determinados en el licor mezcla.

Parámetros	Abreviatura	Ud.	Licor mezcla
			Día 4
pH	pHLM	ud.	x
Conductividad	CondLM	µmS/cm	x
Temperatura reactor	T ^º r	ºC	x
Sólidos en Suspensión del Licor mezcla	SSLM	mg/L	x
Porcentaje Sólidos en Suspensión Volátiles del Licor mezcla	%SSVLM	%	x
Sedimentabilidad del licor mezcla a 30 minutos	V30	mL/L	x
Índice Volumétrico de Fango	IVF	mL/g	x
Índice Volumétrico de Fango Diluido	IVFD	mL/g	x
Nitrógeno total del Licor Mezcla	NTLM	mg/g SSVLM	x
Fósforo total del Licor Mezcla	PTLM	mg/g SSVLM	x
Demanda Química de Oxígeno del Licor Mezcla	DQLM	g/g SSVLM	x

La diferencia en los análisis entre los días 1 y 2 y el día 3 se debe a que en los primeros se intentó estudiar la influencia de la carga orgánica, mientras que en el segundo se obtuvieron los rendimientos del proceso biológico. Finalmente el día 4 se realizó el análisis del licor de mezcla.

Las campañas de muestreo fueron realizadas en las fechas que quedan reflejadas en la tabla 3-4, si bien en la EDAR de Castellón existe una muestra menos (23 muestras) que en Quart-Benager (24 muestras). Las fechas reflejadas en la tabla 3-4 son orientativas ya que hay diferencia en un par de días entre una EDAR y otra.

Tabla 3-4 Muestras y fechas de toma.

Nº de muestra	Fecha de muestreo
1	04/12/2008
2	17/12/2008
3	14/01/2009
4	28/01/2009
5	11/02/2009
6	25/02/2009
7	11/03/2009
8	25/03/2009
9	07/04/2009
10	22/04/2009
11	06/05/2009
12	20/05/2009
13	03/06/2009
14	17/06/2009
15	01/07/2009
16	15/07/2009
17	09/09/2009
18	22/09/2009
19	06/10/2009
20	20/10/2009
21	03/11/2009
22	17/11/2009
23	15/12/2009
24	28/12/2009

Todo ello fue realizado en los laboratorios del Área de Química y Microbiología del Agua del IIAMA, siguiendo los parámetros normalizados (APHA/AWA 2005; Clescerl, Greenberg & Eaton 1999) y se recoge en la tesina de Andrés Zornoza. (Zornoza 2012)

Una vez se analizaron las muestras se dispusieron en portas especialmente diseñados para el análisis de múltiples muestras a fin de economizar a la hora de realizar la hibridación.

Como se puede apreciar en la figura 3-1, los portas poseen una cubierta de teflón que separa cada uno de los 10 pocillos facilitando así que las muestras se coloquen en cada uno de ellos y se pueda realizar la hibridación de los mismos sin que las muestras se vean contaminadas las unas con las otras.

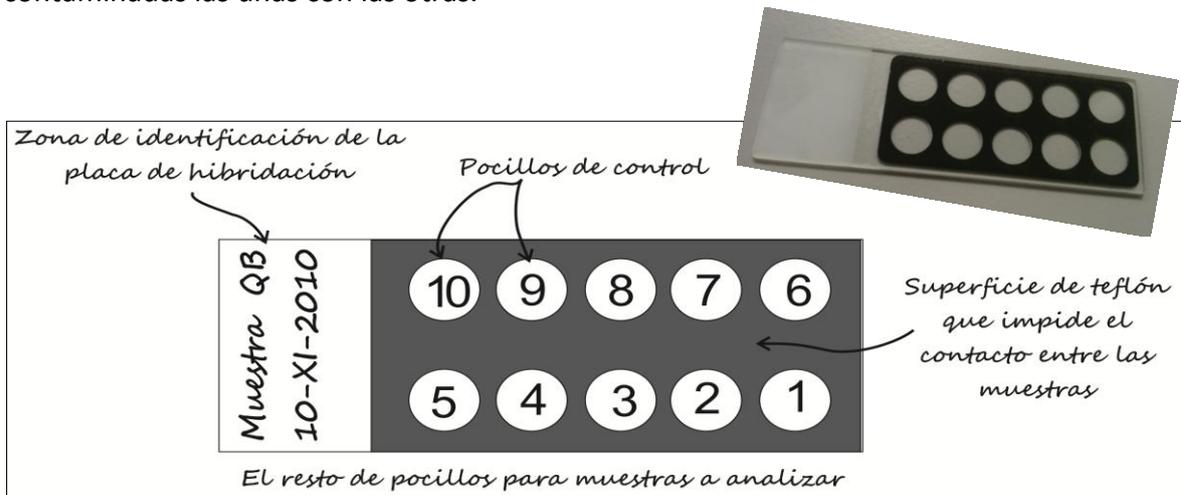


Figura 3-1 Porta con 10 pocillos multi-muestra.

3.2 Técnica FISH

3.2.1 Sonda S-G-Gor-0596-a-A-22

Para poder realizar la cuantificación de bacterias del genero *Gordonia* se ha empleado una sonda de generada sintéticamente. Dicha sonda es la S-G-Gor-0596-a-A-22. Como control positivo y negativo en la técnica FISH hemos empleado dos controles con organismos de referencia para constatar que se ha realizado con éxito las hibridaciones con la sonda GOR 0596.

Por lo que hemos empleado como control positivo una cepa de *Gordonia amarae* CECT³ 5704 y como control negativo *Dietzia maris* CECT 4617.

Las sondas empleadas en las hibridaciones para identificación o cuantificación posterior con epifluorescencia presentan diferentes niveles de especificidad, según:

- Dominio
- Niveles intermedios
- Genero
- Especie

5'- TGC AGA ATT TCA CAG ACG ACG C -3'

5'- TGC AGa ATT TcA CAG ACG aCG C -3' → Sonda LNA (Alonso et al. 2009)

En nuestro caso la GOR 0596 LNA (LNA, Locked Nucleic Acid) es una sonda específica para la identificación de *Gordonia* producida por una marca comercial y que proporciona mayor afinidad y con ello facilita la hibridación.

- Región diana (positions r RNA, *E. coli*): 0596-0617
- Cadena de 22 oligonucleotidos.

En nuestro caso, por ser esta la sonda que empleamos, el porcentaje de formamida empleada en la hibridación ha sido del 25%, un 5% superior al utilizado (20%) con la sonda Gor 0596 diseñada por de los Reyes et al. (1997) (de los Reyes, Ritter & Raskin 1997). La sonda GOR 0596 LNA se trata de una hebra única de DNA a la que se le ha añadido 3 bases LNA en sustitución de las DNA del diseño original, lo que mejora la señal de hibridación (Alonso et al. 2009). En el extremo 5' se ha incorporado una molécula de rodamina para visualizar la reacción de hibridación, la cual presenta una fluorescencia selectiva a ciertas longitudes de onda.

En la figura 3-2 se pueden apreciar los dos picos de longitud de onda característicos del marcador fluorescente empleado (en nuestro caso, la rodamina)

³ CECT (Colección Española de Cultivo Tipo)

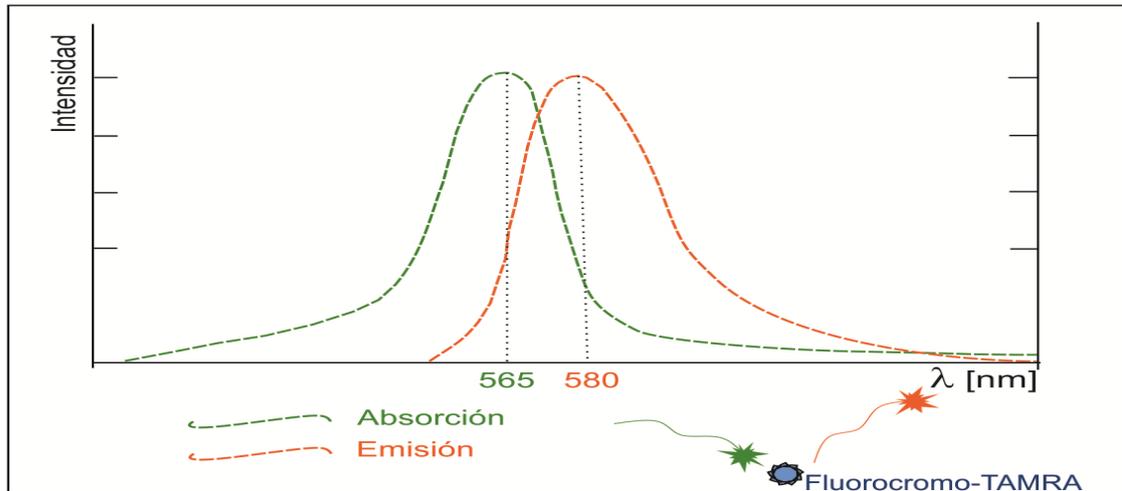


Figura 3-2 Longitud de onda de absorción y emisión de la rodamina.

En este caso la rodamina en concreto es la 5'-Carboxitetrametilrodamina (TAMRA)⁴, dicha rodamina presenta un nivel de absorción a 565 nm (Verde) y emite en una longitud de onda de 580 nm (Rojo).

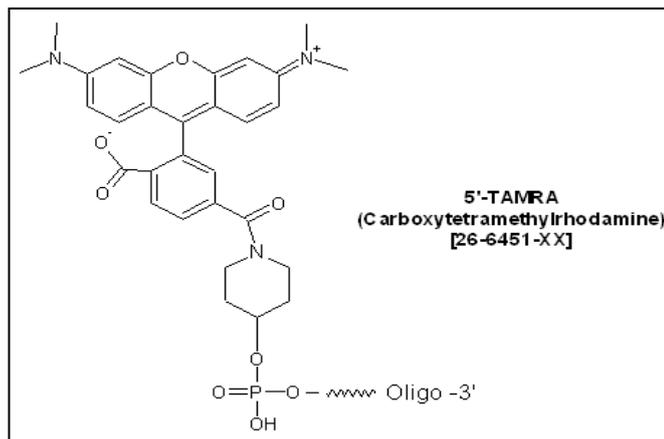


Figura 3-3 Estructura de la rodamina, 5'-Carboxitetrametilrodamina (TAMRA)

Dicha sonda se enlaza con:

- 16S RNA ribosómico → Componente de la subunidad 30S del ribosoma procariótico.

Para asegurar la especificidad de la sonda existen tres factores fundamentales que hemos tenido que tener en cuenta durante el proceso de hibridación.

- 1 Temperatura de hibridación
- 2 Concentración de NaCl
- 3 La concentración de formamida, que realiza la función de tampón de la reacción y favorece la hibridación a bajas temperaturas. La formamida reduce 0.72 °C en la temperatura de hibridación por cada 1% de formamida empleada.

⁴ Formula empírica de la 5'-Carboxitetrametilrodamina: C₂₅H₂₂N₂O₅

3.2.2 Fijación y permeabilización de las muestras.

Para llevar a cabo la técnica FISH ha sido necesario fijar las bacterias ya que su estructura celular debe mantenerse rígida, estática y de esta manera se conserve la morfología favoreciendo la penetración de la sonda. Los pasos y reactivos para la fijación son los siguientes

1. Tomar 1 ml de muestra
2. Centrifugar durante 3 minutos a 7000 rpm.
3. Lavar con 1000 μ l de PBS 1X.
4. Centrifugar durante 3 minutos a 7000 rpm.
5. Resuspender con 250 μ l de PBS 1X y 750 μ l PFA durante 1 minuto.
6. Centrifugar durante 3 minutos a 7000 rpm.
7. Resuspender con 500 μ l de PBS 1X.
8. Centrifugar durante 3 minutos a 7000 rpm.
9. Resuspender con 500 μ l de PBS 1X + 550 μ l EtOH abs.

Una vez fijadas las muestras se conservan a - 20°C.

Al tratarse el género *Gordonia* de bacterias Gram positivas con ácidos micólicos, la permeabilización puede ser problemática en algunas ocasiones, (Macnaughton 1994). Se utilizan protocolos alternativos con lipasa, lisozima, mutanolisina o CIH. En este trabajo se han permeabilizado las células de *Gordonia* con un tratamiento enzimático con lisozima a 37°C durante 30 minutos.

3.2.3 Tratamiento de los portaobjetos FISH cubiertos con Teflón

- Lavar con solución de limpieza
- Enjuagar con agua destilada
- Secar al aire (dejar escurrir todo 1 día) (proteger del polvo ambiental cubriendo los portas con papel aluminio)
- Cubrir con gelatina por inmersión en la solución de gelatina 0,1% con cromato sulfato potásico 0,01% (preparada en el momento, temperatura 60°C)
- Secar al aire

3.2.4 Aplicación de las muestras a los portaobjetos FISH

1-Poner un volumen entre 3 y 5 μ l de muestra fijada al portaobjetos FISH (4 μ l)

2-Secar al aire o estufa.

3-Tratamiento con lisozimas

3.1- 20 μ l de lisozima por pocillo 53000 V/ml



3.2- 30' a temperatura ambiente y atmósfera húmeda. Tubo Sarstedt con papel humedecido con 1ml con agua MilliQ.

3.3- Lavar en Agua MilliQ.

3.4- Secar al aire

4-Deshidratar en etanol 50% durante 3 minutos (por inmersión)

5-Deshidratar en etanol 80% durante 3 minutos (por inmersión)

6-Deshidratar en etanol absoluto durante 3 minutos (por inmersión)

Nota: Después de la deshidratación, los portas pueden ser conservados indefinidamente

3.2.5 Hibridación "in situ"

1. Preparar la solución de hibridación con formamida (ver página 31) (en un eppendorf de 2 ml).
2. De la solución de hibridación con formamida, reservar en un eppendorf $6 \times (10-n) \mu\text{l}$, siendo n el volumen de sonda utilizada en cada pocillo. Así,

6= número de pocillos en el porta

10=volumen total en μl por pocillo

si $n=1 \mu\text{l}$ guardaremos $54 \mu\text{l}$

si $n=2 \mu\text{l}$ guardaremos $48 \mu\text{l}$

3. Añadir al eppendorf reservado $6 \mu\text{l}$ de sonda (6 pocillos por porta = $6 \mu\text{l}$ sonda)
4. Poner un trozo de papel de celulosa dentro de un tubo Sarstedt de 50 ml y echar sobre el papel la solución de hibridación sin sonda.
5. Poner $9 \mu\text{l}$ de la solución de hibridación + $1 \mu\text{l}$ de sonda en cada pocillo y repartir homogéneamente por todo el campo.
6. Introducir el porta dentro del tubo Sarstedt, manteniendo siempre la posición horizontal.
7. Incubar a 46°C durante 1h 30min
8. Preparar 50 ml de la solución de lavado (ver preparación reactivos) (Atemperar a 48°C)
9. Sacar del horno y rápidamente lavar los portas e introducirlos dentro del tubo con la solución de lavado.
10. Incubar en un baño a 48°C durante 15-20 min
11. Lavar con agua destilada
12. Secar al aire en la oscuridad
13. Si no se observa al microscopio inmediatamente, guardar el porta a -20°C dentro de un tubo Sarstedt 50 ml.

3.2.6 Reactivos para la realización de la técnica FISH

A continuación se describen los reactivos necesarios para llevar a cabo la técnica FISH, así como su preparación.



Figura 3-4 Material empleado para la realización de la técnica FISH.

3.2.6.1 Paraformaldehído (Fijación)

- 1.- Calentar 65 ml de agua bidestilada hasta 60°C
- 2.- Añadir 4 g de paraformaldehído (PFA)
- 3.- Añadir 1 gota de una solución de NaOH 2M y agitar rápidamente hasta que la solución se haya clarificado
- 4.- Quitar de la fuente de calor y añadir 33 ml de PBS 3X.
- 5.- Ajustar el pH a 7,2 con ClH.
- 6.- Eliminar cualquier resto de cristales por filtración a través de 0,2 μm .
- 7.- Enfriar rápidamente a 4°C y conservar a esta temperatura.

3.2.6.2 Tampón fosfato salino (1XPBS) (Fijación)

- Esterilizar por filtración 0,45 μm ó 0,2 μm
- Conservar a 4°C, porque se utiliza frío

(preparar 3X) para reactivo paraformaldehído):

Concentración 3X PBS:



NaCl	22,8 g
NaH ₂ PO ₄	3 g
Na ₂ HPO ₄	2,88 g
Agua destilada	1000 ml
PH	7,4

Preparación: primero disolver los fosfatos y luego el cloruro sódico

- Esterilizar por filtración 0,45 µm ó 0,2 µm
- Conservar a 4°C, porque se utiliza frío

3.2.6.3 Solución de Gelatina (preparación portaobjetos)

Gelatina	0,1%
Sulfato potásico cromato	0,01% (Sigma ref. C-5926, 12H ₂ O)

1. Calentar previamente el agua destilada hasta 60°C
2. Fundir la gelatina (100 mg 0,1% + 10 mg sal de cromato. 12H₂O, 0,01%) en 100 ml de agua destilada
3. Enfriar a 50°C para sumergir los portas.

3.2.6.4 Solución de limpieza de portaobjetos FISH

- Reactivo de limpieza:
- Etanol con 10% KOH

3.2.6.5 Etanol 100% (Fijación y lavado)

- Reactivo etanol absoluto grado PRS

Guardar a T. ambiente para lavados y a 4°C para fijación

3.2.6.6 Etanol 80% (lavado)

- Etanol absoluto 160 ml
- Agua destilada 40 ml

Guardar a T. Ambiente

3.2.6.7 Etanol 50% (lavado)

- Etanol absoluto 100 ml
- Agua destilada 100 ml

Guardar a T. ambiente

3.2.6.8 Cloruro sódico 5M (tampón de hibridación y tampón de lavado)

- Cloruro sódico 292.2g
- Agua destilada 1000 ml

1. Disolver el ClNa en 800 ml de agua destilada y Ajustar el volumen hasta 1 litro.
2. Distribuir en alícuota.
3. Esterilizar en autoclave 121°C durante 15 minutos y por filtración

3.2.6.9 EDTA 0.5M (cuando la concentración de formamida es > o igual a 20%)

- Esterilizar en autoclave 121°C durante 15 minutos y por filtración

3.2.6.10 Tris-HCl 1M pH 8.0 (tampón de hibridación y tampón de lavado)

- Tris Base 121,1 g
- H-Cl 42 ml de HCl concentrado
- Agua destilada hasta 1000 ml

Preparación: pesar el Tris y añadir a 800 ml de agua destilada. Añadir 42 ml de HCl concentrado y completar hasta 1000 ml con agua destilada.

Esterilizar en autoclave 121° durante 15 minutos y filtración

3.2.6.11 Agua Mili-Q (tampón de hibridación y tampón de lavado)

- Agua Milli-Q 200 ml

Esterilizar en autoclave 121°C durante 15 minutos y filtración

3.2.6.12 SDS 10% (tampón de hibridación y tampón de lavado)

- SDS 10 g
- Agua destilada Hasta 100 ml

Esterilizar en autoclave y por filtración

3.2.6.13 Formamida (tampón de hibridación y tampón de lavado)

- Formamida

Volúmenes de Formamida y % en función de la sonda. Ver tabla 3-6.

Guardar a T^a. ambiente

3.2.6.14 Tampón de hibridación

Preparar en tubo de microcentrífuga de 2 ml

Tabla 3-5 Compuestos del tampón de hibridación

	Concentración inicial	Volumen	Concentración final
NaCl	5M	360 µl	0,9M
HCl-Tris	1M	40 µl	20mM (pH 8,0)
SDS	10%	2 µl	0,01% Formamida (0-50%)

Tabla 3-6 Volumen de reactivos de hibridación en función del porcentaje de formamida empleado

Reactivo	% de Formamida									
	10 %	20 %	25 %	30 %	35 %	40 %	45 %	50 %		
NaCl 5M	360 µl	360 µl	360 µl	360 µl	360 µl	360 µl	360 µl	360 µl	360 µl	
HCl-Tris 1M	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl	
Formamida	200 µl	400 µl	500 µl	600 µl	700 µl	800 µl	900 µl	1000 µl		
H2O MilliQ	1398 µl	1198 µl	1098 µl	998 µl	898 µl	798 µl	698 µl	598 µl		
SDS 10%	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	
Volumen final	2000 µl	2000 µl	2000 µl	2000 µl	2000 µl	2000 µl	2000 µl	2000 µl	2000 µl	

Para portas de 10 pocillos: Reservar en un eppendorf 10 x (10-n) µl. (n = sonda).

En nuestro caso:

$$10 \times (10 - 1) \mu l = 90 \mu l$$

3.2.6.15 Tampón de lavado

Se preparó un tampón de lavado para eliminar los restos de la hibridación.

Los volúmenes que se emplearon de los reactivos se recogen en la tabla 3-7.

Tabla 3-7 Volumen de reactivos de lavado según el porcentaje de formamida empleado.

Reactivo	% de Formamida									
	10 %	20 %	25 %	30 %	35 %	40 %	45 %	50 %		
NaCl 5M	4500 µl	2150 µl	1490 µl	1020 µl	700 µl	460 µl	300 µl	180 µl		
EDTA 0.5M	- µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl		
HCl-Tris 1M	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl		
H2O MilliQ	44.45 ml	46.30 ml	46.96 ml	47.43 ml	47.75 ml	47.99 ml	48.15 ml	48.27 ml		
SDS 10%	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl		
Volumen final	50000 µl	50000 µl	50000 µl	50000 µl	50000 µl	50000 µl	50000 µl	50000 µl		
	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml		

Guardar a 4°C

3.2.6.16 Sondas marcadas

Concentración sonda madre e hija

Concentración de trabajo rango entre 25-50 ng

3.2.6.17 Citifluor⁵

Reactivo para evitar pérdida de fluorescencia ya que el fluorocromo con el que están marcados los fragmentos de ARN de las sondas sufren ataques químicos que reducen su luminiscencia.

⁵ Citifluor Ltd. www.citifluor.com/index.php

3.3 Observación de bacterias filamentosas y recogida de datos

3.3.1 Observación con microscopio de epifluorescencia

En la cuantificación de los filamentos del género *Gordonia* hemos empleado un microscopio de epifluorescencia (Ver, figura 3-5). Se trata de un microscopio óptico en el que la luz no atraviesa la muestra estudiada, sino que incide sobre la muestra sin atravesarla. Estos equipos emplean la fluorescencia o la fosforescencia en lugar de la absorción o la reflexión.

La imagen observada es resultado de la radiación electromagnética emitida por las moléculas que han absorbido la excitación primaria y emitiendo una luz con una mayor longitud de onda. Además, permiten la selección de longitud de onda con la que la muestra es iluminada provocando así la excitación del fluoróforo y la fluorescencia de las muestras hibridadas para una mejor identificación ya que de esta manera solo las células bacterianas que han sido exitosamente hibridadas presentan fluorescencia.



Figura 3-5 Sala de microscopía y microscopio de epifluorescencia Olympus BX 50.

Para poder excitar la muestra se hace una selección de la longitud de onda con la que la muestra será excitada y esto lo conseguimos mediante la interposición de diversos filtros tras el condensador y sobre el objetivo (Stryer & Haugland 1967).

En la figura 3-6 de manera esquemática podemos observar como de la fuente de luz, que en nuestro caso es una lámpara de mercurio, es emitido un haz de luz con diversas longitudes de onda.

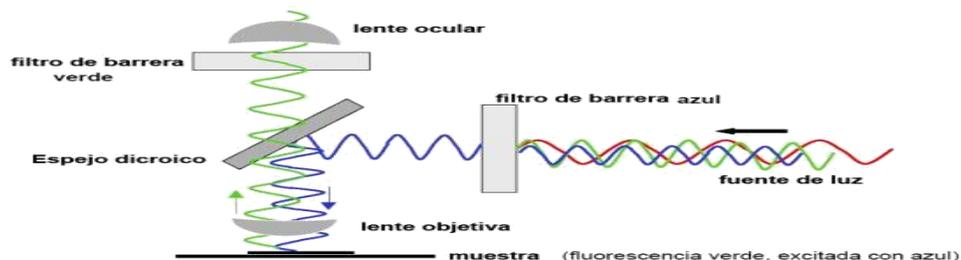


Figura 3-6 Esquema de funcionamiento del microscopio de epifluorescencia⁶.

⁶ Fuente: Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. (Uruguay)

Como ya hemos comentado, la luz emitida por la fuente pasa por diversos filtros. La selección de los filtros empleados está condicionada por el tipo de fluorocromo que empleamos en nuestra sonda y por lo tanto en la hibridación. En nuestro caso particular, la combinación es:

1. Filtro excitador: Olympus U-MWIG (Entre 520 y 550 nm)
2. Espejo dicrómico: selección a 565 nm
3. Filtro de barrera verde: selección a 580 nm

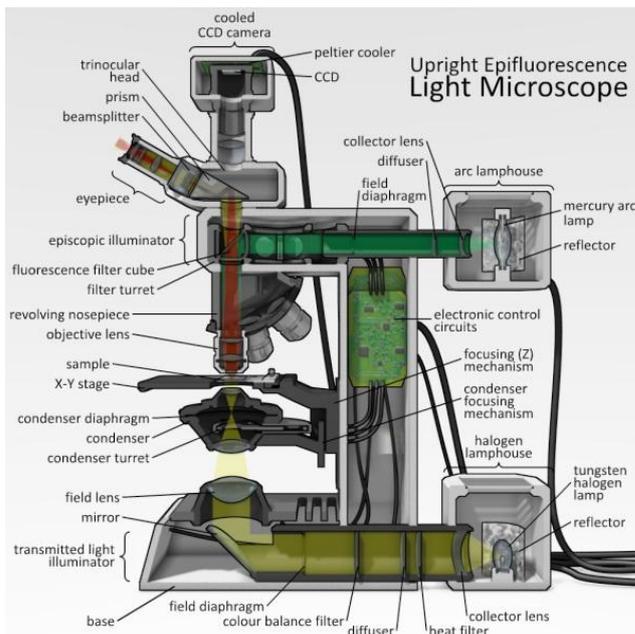


Figura 3-7 Microscopio de epifluorescencia con sus principales componentes.⁷

Como se puede apreciar en la figura 3-6, la longitud de onda con la que se ilumina la muestra hibridada con nuestra sonda es seleccionada para el rango en el que el fluorocromo se excita y por lo tanto es capaz de emitir posteriormente.

Se puede apreciar en la gráfica de la figura 3-8 que la longitud de onda de la luz que incide sobre la muestra hibridada con Rodamina-TAMRA es de 565 nm (Verde) y la emisión de luz se produce a 580 nm (Rojo)

⁷ Fuente: RichardWheeler.net

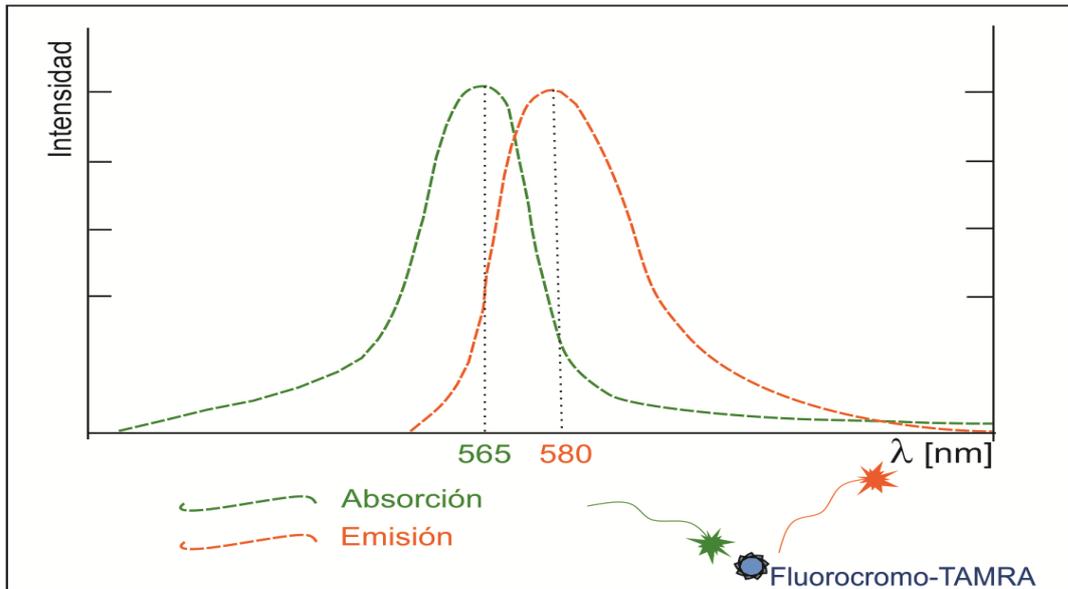


Figura 3-8 Espectro de absorción y emisión de 5'-Carboxitetrametilrodamina.

Al realizar el proceso de hibridación y el posterior lavado, solo la sonda que se han fijado (es decir hibridada) permanece y por lo tanto se produce la luminiscencia de la muestra.

Posteriormente se realizó la observación de la muestra mediante un barrido a 600X. Se localizaron flóculos en cada muestra que fueran representativos y se realizó la cuantificación.

Mediante la cámara montada en el microscopio se tomaron imágenes que fueran ilustrativas del trabajo, pero no fue el objetivo del presente trabajo documentar fotográficamente cada una de las muestras ya que no se iba a realizar ningún estudio posterior con dichas imágenes.

3.3.2 Estimación de *Gordonia* spp.

La estimación de bacterias que encontramos en las muestras y que previamente hemos hibridado, se realiza empleando un microscopio de epifluorescencia como ya se ha descrito.

Una vez la muestra se coloca en el microscopio se selecciona una región de la muestra que sea representativa del resto y se estima siguiendo el criterio subjetivo de Eikelboom (Eikelboom 2002) según se recoge en la tabla 3-8.

Los comentarios sobre las observaciones y los datos de las estimaciones se recogieron en una plantilla realizada a tal efecto (Figura 3-9).

Tabla 3-8 Escala del Índice subjetivo de Eikelboom (IF)

IF	Abundancia	Explicación
0	Ninguno	No se observan
1	Pocos	Se observa en un flóculo ocasional
2	Algunos	Comunes pero no presentes en todos los flóculos
3	Común	En todos los flóculos con una densidad 1-5/floc.
4	Muy común	En todos los flóculos con una densidad 5-20/floc.
5	Abundante	En todos los flóculos con una densidad > 20 fil/floc.

El formulario que podemos ver en la figura 3-9 fue diseñado para facilitar las observaciones en la sala de microscopía.

Fecha _____

NOMBRE PORTA _____

Hibridación

Hora de inicio _____ Tiempo total de hibridación % formamida _____

Hora de fin _____

Sonda _____

1	_____
2	_____
3	_____
4	_____
5	_____
6	_____
7	_____
8	_____
9	_____
10	_____

5	10
4	9
3	8
2	7
1	6

COMENTARIOS

1 _____

2 _____

3 _____

4 _____

5 _____

6 _____

7 _____

8 _____

9 _____

10 _____

Índice F						
Ø	F0	F1	F2	F3	F4	F5
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						

Figura 3-9 Formulario para la observación y cuantificación.

Tengamos en cuenta que se trabaja con muy poca luz y es necesario tener una visión clara de las notas que se van tomando con el fin de recoger el máximo de información posible.

Cada porta preparado fue identificado con un código numérico de la observación y le correspondía una de estos formularios.

3.4 Imágenes tomadas de muestras híbridadas.

Las hibridaciones de muestras que se llevaron a cabo fueron posteriormente observadas mediante un microscopio de epifluorescencia.

Se han incluido una selección de imágenes en la siguiente página para ilustrar las observaciones realizadas en laboratorio con el microscopio de epifluorescencia de las muestras híbridadas.

Nuestro trabajo consistió en, una vez realizadas las hibridaciones, realizar la observación de las muestras con el fin de cuantificar el nivel de bacterias filamentosas mediante el índice subjetivo de Eikelbomm. Se realizaron barridos de las muestras con el fin de localizar flóculos que fueran representativos de las mismas y poder cuantificar los filamentos en las mismas. Los filamentos al estar asociados a los flóculos se observan parcialmente, pero solo se cuantifica el número de filamentos observados y no la longitud de los mismos ni las ramificaciones.

A pesar de ello, en este trabajo, se han tomado notas de las características de las muestras observadas con el fin de que puedan ser empleados en futuras investigaciones.

Las hojas de observación se recogieron detalles de las muestras como el nivel de ramificación o la longitud de los filamentos.

Todas las imágenes que se muestran en este trabajo fueron tomadas de las muestras estudiadas con los equipos del Departamento de Química y Microbiología del Agua que dirige Jose Luis Alonso. En ellas se pueden ver muestras exitosamente híbridadas en las que existe un nivel de filamentosas desiguales (ver figura 3-10, figura 3-12, figura 3-13, figura 3-14 y figura 3-15). Todas estas imágenes fueron tomadas con la cámara digital montada en el microscopio de epifluorescencia modelo Olympus BX 50.

La figura 3-11 es una imagen tomada directamente desde el ocular del microscopio con una cámara compacta convencional. Se ha incluido ya que presenta una mayor amplitud de campo y es ilustrativa del campo de trabajo que tiene el observador a la hora de trabajar con estos equipos de microscopía.

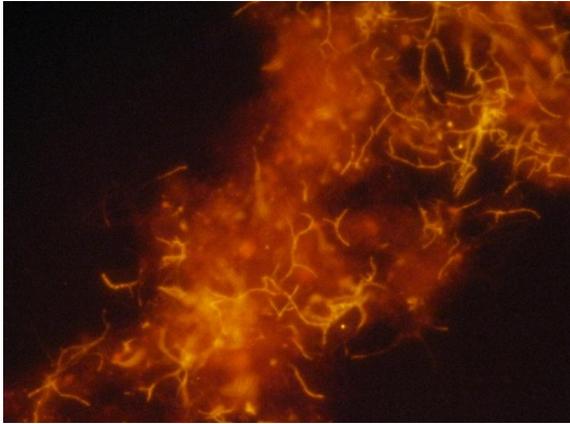


Figura 3-10 Muestra hibridada de Gordonia en la que se aprecia la hibridación, 1000X.

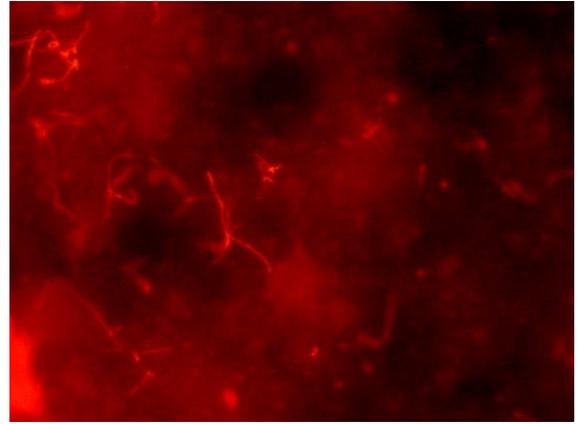


Figura 3-13 Muestra hibridada de Gordonia en la que se aprecia la hibridación, 1000X.

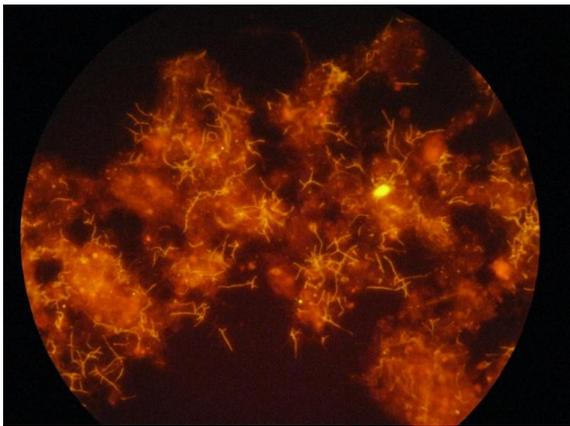


Figura 3-11 Imagen tomada con cámara compacta (Canon Ixus 620) directamente del ocular.

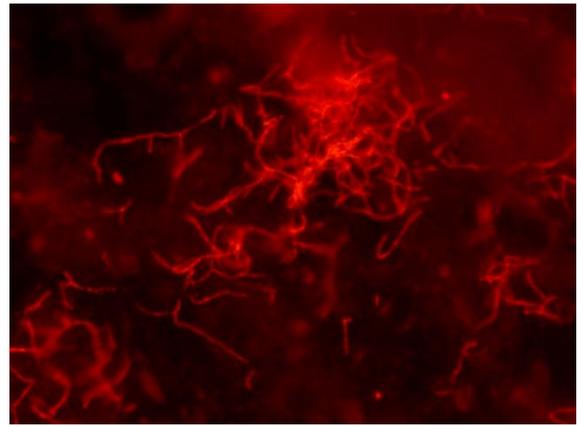


Figura 3-14 Muestra hibridada de Gordonia en la que se aprecia la hibridación, 1000X.

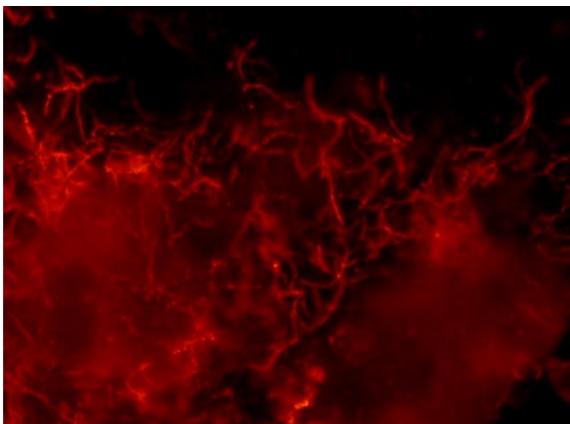


Figura 3-12 Muestra hibridada de Gordonia en la que se aprecia la hibridación, 1000X.

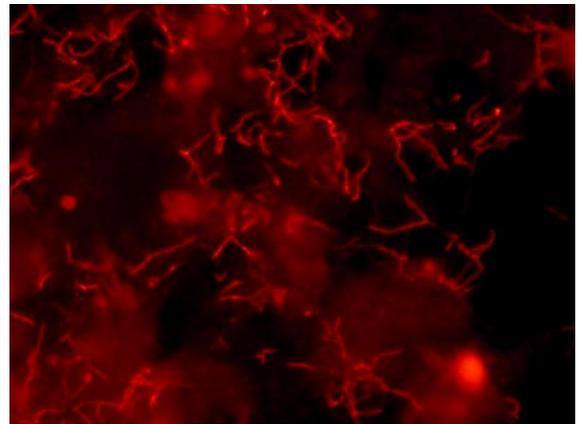


Figura 3-15 Muestra hibridada de Gordonia en la que se aprecia la hibridación, 1000X.

3.5 Microscopía convencional versus FISH

Se han realizado muchos estudios sobre bacterias filamentosas en EDAR con diferentes sistemas de tratamiento para comprender mejor su abundancia y los factores que determinan su presencia, como la composición del agua residual y el diseño y operación de la EDAR (Kampfer 1997; Madoni, Davoli & Gibin 2000; van der Waarde et al. 2002). Se han definido grupos específicos de bacterias filamentosas en base a sus preferencias en las condiciones de operación y se han propuesto medidas de control para algunos de ellos (Eikelboom 2000; Jenkins, Richard & Daigger 2003; Wanner & Grau 1989; Wanner 1994). Sin embargo, un mayor obstáculo para una correcta interpretación de estos grupos específicos y su relación con los correspondientes parámetros operacionales es que la identificación no incluía métodos moleculares, por lo que la fiabilidad de sus bases de datos para estas conclusiones es cuestionable. Recientes estudios han revelado que es difícil y cuestionable la identificación de las bacterias filamentosas solo en base a su morfología y tinciones, por lo que es recomendable la utilización de la técnica FISH o cualquier otro método molecular (Mielczarek et al. 2012).

Se han identificado más de 30 morfotipos filamentosos de bacterias en EDAR que tratan aguas residuales domésticas (Eikelboom 2000). Se ha determinado que las poblaciones bacterianas que mayor influencia tienen en el desarrollo del foaming son actinobacterias que contienen ácidos micólicos en su membrana, también llamadas Micolata (Seviour & Nielsen 2010; Kragelund et al. 2007). Entre las bacterias formadoras de espumas encontramos dentro del grupo Mycolata, *Gordonia* spp., *Tsukamurella* spp., *Rhodococcus* spp. y *Skermania piniformis* y otras bacterias no mycolatas como *Nostocoida limicola*, Tipo 0092, Tipo 0041/0675 y Tipo 0803 (Seviour & Nielsen 2010)

La comparación de los resultados obtenidos mediante FISH y lo que se obtuvieron en otras investigaciones, llevadas a cabo por el laboratorio de Química y Microbiología del agua, muestran pequeñas discrepancias entre los valores que no hemos encontrado significativas ya que la identificación convencional presenta limitaciones cuando se ha de identificar bacterias que se encuentran alojadas en el interior del flóculo.

Lo que sí es evidente es que la población de bacterias Mycolata que fueron encontradas en las observaciones llevadas a cabo por técnicas convencionales son del género *Gordonia* ya que coinciden prácticamente en la totalidad de las observaciones tal y como se puede observar en el apartado 4.1.

Comentarios sobre los valores de FI encontrados: en un estudio en Dinamarca sobre 28 EDAR los valores de abundancia de bacterias filamentosas determinados con la técnica FISH (FI=2-3) podían influir en una menor sedimentabilidad de los fangos (Mielczarek et al. 2012). El IVFD (índice volumétrico de fangos diluido) es una medida de la sedimentabilidad del fango, valores por encima de 120 mg/l indican una mala sedimentabilidad del fango (Eikelboom 2002; Jenkins, Richard & Daigger 2003; van der Waarde et al. 2002). La distribución del IVFD para las 2 EDAR se presenta en la tabla 3-9.

Tabla 3-9 Valores de IVFD en las EDAR

Variable	Unidades	Media	Max.	Mini.	Desv.
IVFD Quart-Benager	(mL/g)	119	167	59	27
IVFD Castellón Línea 1	(mL/g)	109	161	81	20
IVFD Castellón Línea 2	(mL/g)	109	160	64	29

Las bacterias del grupo mycolata presentan principalmente dos morfotipos.

El primero, compartido por bastantes géneros bacterianos de Micolata, posee filamentos ramificados en ángulo recto. Estructura ramificada que si bien son fundamentales para la estabilidad del floculo, a su vez su excesiva proliferación facilitan la retención de aire en la estructura interna del flóculo favoreciendo así su flotación. Este morfotipo fue descrito por primera vez asociado a la bacteria *Gordonia amarae* por Lechevalier en el año 1974, los organismos con este morfotipo son denominados habitualmente como GALO (*G. amarae*-like organisms).

El segundo, presenta un ángulo agudo en las ramificaciones de los filamentos que desarrollan y reciben el nombre *Skermania piniformis* (Chung et al. 1997)

En nuestro caso, *Gordonia* es un género compuesto por un amplio grupo de especies. Estas presentan crecimiento lento, son bacterias que pueden crecer en ambientes aerobios, anóxico (tanto con NO_3^- , como con NO_2^- como aceptores terminales de electrones) e incluso en ambientes anaerobios. (Kragelund et al. 2007)

Presentan una tasa de crecimiento máximo (μ_{max}) relativamente baja, lo que las hace susceptibles a métodos de control cinético en las EDAR.

En EDAR de Dinamarca se ha observado una baja dinámica poblacional de las bacterias filamentosas, lo que puede ser debido a que son EDAR que eliminan nutrientes (condiciones de operación anaerobias, óxicas-anóxicas), con una larga estabilidad operacional, edades del fango altas (20-35 días), moderado rango en la temperatura anual (7-20 °C) y poca complejidad en la composición del agua residual, todos estos factores pueden servir para estabilizar la comunidad bacteriana (Mielczarek et al. 2012). Existen muy pocos estudios que hayan realizado análisis estadístico de las poblaciones de bacterias filamentosas (analizadas con la técnica FISH) para intentar establecer las relaciones entre las características específicas de la EDAR con la actividad de las bacterias (Lopez-Vazquez et al. 2008). En un estudio sobre 28 EDAR en Dinamarca no se pudieron establecer correlaciones estadísticamente significativas entre las poblaciones de bacterias filamentosas analizadas con la técnica FISH y las características de diseño y operacionales de las EDAR, porque las variaciones temporales eran muy pequeñas, y hacía imposible establecer estas correlaciones. Los principales factores que afectan a las poblaciones de bacterias filamentosas son la composición del agua residual del afluente y los mayores cambios operacionales en la EDAR (Mielczarek et al. 2012)

3.6 Análisis estadístico.

Las variables medidas en el estudio y que pasan a formar parte del análisis estadístico de los datos son un total de 42. Las cuales se distribuyen de la siguiente manera:

26 variables correspondientes a parámetros Físico-Químicos (Ver tabla 3-10).

10 variables correspondientes al Licor de Mezcla (Ver tabla 3-11).

6 variables Operacionales (Ver tabla 3-10).

Tabla 3-10 Variables físico-químicas

PARÁMETROS	ABREVIATURAS	Unidades
pDQOs3	pDQOs3	%
DQO/DBO	DQOxDBO	
Carga Nitrógeno total	CNT	Kg NT/Kg SSVLM.d
Carga Nitrógeno total soluble	CNTs	Kg NTs/Kg SSVLM.d
N-NH4	N_NH4_af	mg/L
porcentaje N-NH4	%N-NH4	%
Carga N-NH4	CN-NH4	Kg N_NH4/Kg SSVLM.d
Carga N-org soluble	CN_orgs	g N_orgs/Kg SSVLM.d
Carga fósforo total	CPT	g PT/Kg SSVLM.d
Carga fósforo total soluble	CPTs	g PTs/Kg SSVLM.d
P-PO4 afl.	P_PO4_af	mg/L
Porcentaje P-PO4 afl.	%P_PO4_af	%
Carga P-PO4	CP_PO4	g P_PO4/Kg SSVLM.d
Carga de P-org soluble	CP_orgs	g P_orgs/Kg SSVLM.d
DBO5/NKT	DBO5/NKT	
DBO5/PT	DBO5/PT	
T. aniónicos afl.	Tensani_af	mg/L
Carga tensioactivos aniónicos	CTA	g TA/Kg SSVLM.d
Carbohidratos	CARBO	mg/L
Carga Carbohidratos	CCARBO	g Carbo/Kg SSVLM.d
Proteínas	Prote	mg/L
Carga Proteínas	Cprote	g Prote/Kg SSVLM.d
Aceites y grasas	AG	mg/L
Carga Aceites y grasas	CAG	g AG/Kg SSVLM.d
Ácidos Grasos Volátiles	AGV	mg/L
Carga Ácidos Grasos Volátiles	CAGV	g AGV/Kg SSVLM.d

Tabla 3-11 Variables del licor mezcla

PARÁMETROS	ABREVIATURAS	Unidades
pH	pH	
Conductividad	Conductividad	μS/cm
Sólidos en Suspensión de Licor de Mezcla	S.S.L.M	(mg/L)
Sólidos en Suspensión Volátiles de Licor de Mezcla	S.S.V.L.M.	(mg/L)
Porcentaje de Sólidos en Suspensión Volátiles de Licor de Mezcla	S.S.V.L.M.	(%)
Índice Volumétrico de Fango	IVFD.	(mL/g)
Nitrógeno Total del Licor de Mezcla	NTLM	(mg/L)
Fósforo Total del Licor de Mezcla	PTLM	(mg/L)
Demanda Química de Oxígeno de SSLM	DQO SSLM	(mg/L)
temperatura	temperatura	°C

Tabla 3-12 Variables operacionales

PARÁMETROS	ABREVIATURAS	Unidades
Carga Másica en DBO	CMdbo	Kg DBO5/kg SSVLM.d
Tiempo de Retención Hidráulico del reactor	TRHr	h
Edad del Fango	EF	días
Porcentaje de día con Oxígeno bajo	O_bajo	% de día
Porcentaje de día con Oxígeno medio	O_medio	% de día
Porcentaje de día con Oxígeno alto	O_alto	% de día

Todo ello da como resultado una matriz que se muestra figura 3-16.

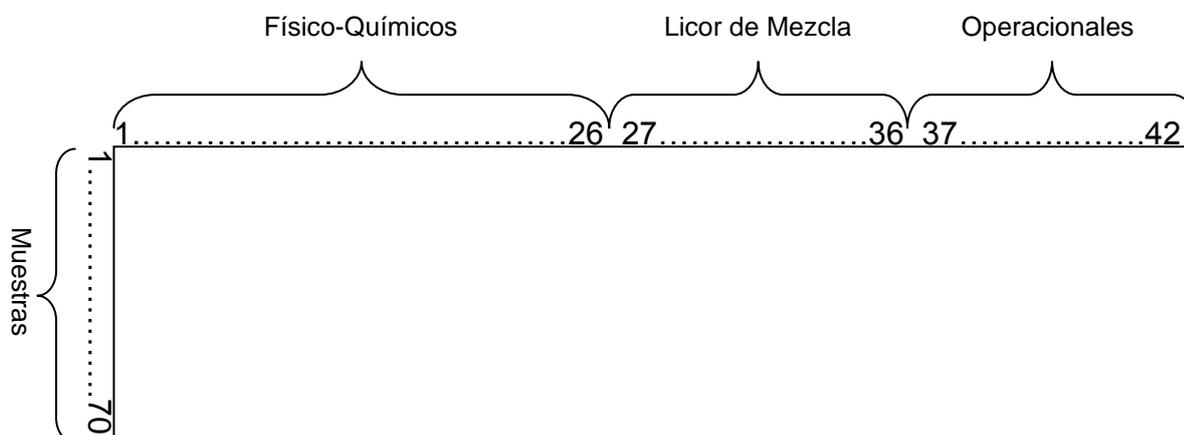


Figura 3-16 Esquema de la matriz de datos.

Se realizaron un total de 70 muestreos, como ya hemos comentado en el apartado correspondiente, en cada una de las plantas depuradoras. Con lo que el número de muestras utilizado en el análisis estadístico es el siguiente:

- 24 muestras en Quart-Benager
- 23 muestras en la Línea 1 de Castellón
- 23 muestras en la Línea 2 de Castellón.

Como se ha comentado anterior mente, se han considerado las dos líneas de Castellón como EDAR independientes ya que las variables operacionales son diferentes con lo que funcionan forma diferente. Este hecho es muy interesante ya que nos proporciona la oportunidad de poder estudiar el resultado de tratamientos diferentes sobre un afluente común y poder así comprobar cuales son las diferencias que aparecen a la salida.

En la tabla 3-13 y tabla 3-14 se especifican las fechas en las que se realizaron los muestreos en cada EDAR estudiada.



Tabla 3-13 Fechas de muestreo de Quart- Benager

Número de muestra	Fecha de muestreo
1	04/12/2008
2	17/12/2008
3	14/01/2009
4	28/01/2009
5	11/02/2009
6	25/02/2009
7	11/03/2009
8	25/03/2009
9	07/04/2009
10	22/04/2009
11	06/05/2009
12	20/05/2009
13	03/06/2009
14	17/06/2009
15	01/07/2009
16	15/07/2009
17	09/09/2009
18	22/09/2009
19	06/10/2009
20	20/10/2009
21	03/11/2009
22	17/11/2009
23	15/12/2009
24	28/12/2009

Tabla 3-14 Muestreos en líneas 1 y 2 de Castellón

Número de muestra	Fecha de muestreo
1	03/12/2008
2	17/12/2008
3	14/01/2009
4	28/01/2009
5	11/02/2009
6	25/02/2009
7	11/03/2009
8	25/03/2009
9	22/04/2009
10	06/05/2009
11	20/05/2009
12	03/06/2009
13	17/06/2009
14	01/07/2009
15	15/07/2009
16	09/09/2009
17	23/09/2009
18	07/10/2009
19	21/10/2009
20	04/11/2009
21	18/11/2009
22	16/12/2009
23	28/12/2009

Se han obtenido, como podremos ver más adelante, las tablas en las que se recogen el máximo y mínimo, la media y la desviación típica de los datos, tanto de las variables Físico-Químicas, de las variables operacionales y de los resultados del licor de mezcla.

Se realizó la normalización de los datos según la ecuación 3-1 para datos que no siguen una distribución normal (Esteban, Tellez & Bautista 1991):

$$Y = \ln (X + 1)$$

Ecuación 3-1 Expresión de normalización de datos.

3.6.1 Coeficiente de Spearman

El coeficiente de correlación de Spearman, ρ (ro) es una medida de la correlación (la asociación o interdependencia) entre dos variables aleatorias continuas. Para calcular ρ , los datos son ordenados y reemplazados por su respectivo orden.

$$\rho = 1 - \frac{6 \sum D^2}{N(N^2 - 1)}$$

Ecuación 3-2 Coeficiente de correlación de Spearman.

Donde:

- D, es la diferencia entre los correspondientes estadísticos de orden de x - y.
- N, es el número de parejas.

Se tiene que considerar la existencia de datos idénticos a la hora de ordenarlos, aunque si éstos son pocos, se puede ignorar tal circunstancia

Para muestras mayores de 20 observaciones, podemos utilizar la siguiente aproximación a la distribución t de Student.

$$t = \frac{\rho}{\sqrt{(1 - \rho^2)/(n - 2)}}$$

Ecuación 3-3 Distribución t de Student.

La interpretación de coeficiente de Spearman es igual que la del coeficiente de correlación de Pearson. Oscila entre -1 y +1, indicándonos asociaciones negativas o positivas respectivamente, 0 cero, significa no correlación pero no independencia. La tau de Kendall es un coeficiente de correlación por rangos, inversiones entre dos ordenaciones de una distribución normal bivalente.

Se han seleccionado solo los valores que presentan un nivel medio y alto de significación bilateral:

- *. La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).
- ** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

3.6.2 Análisis computacional. Coeficiente de correlación de Spearman.

El análisis estadístico de los datos para la obtención del el coeficiente de Spearman ha sido realizado con el software informático SPSS versión 19.

Dicho programa presenta una matriz en la que cada variable es enfrentada con el resto de las variables y se obtienen los siguientes resultados:

Coeficiente de correlación de Spearman. Que como ya se ha comentado con anterioridad oscila entre -1 y 1.

3.6.3 Análisis de Componentes Principales (PCA)

El análisis de componentes principales fue desarrollado por el científico británico Karl Pearson⁸ creador de la constante que lleva su nombre y uno de los padres de la estadística en el siglo XIX. Trabajó en el estudio (Pearson 1901) de los ajustes ortogonales, que dio pie al desarrollo del análisis de componentes principales, en 1901. De manera independiente en



⁸ Karl Pearson, (Londres, marzo de 1857- Londres, abril de 1936)

1933 Harold Hotelling⁹ desarrolló la técnica con el nombre de PCA propiamente dicho (Hotelling 1933; Hotelling 1936).

El problema central en el análisis de datos multivariantes es la reducción de la dimensionalidad. Ya que se disponen en estudios de ecofisiología bacteriana de una cantidad ingente de variables, es muy deseable poder agregarlas en unas nuevas variables fruto de la combinación lineal de las anteriores y descartando variables que no proporcionen variabilidad a la muestra.

Es decir, si es posible describir con precisión los valores de p variables por un pequeño subconjunto $r < p$ de ellas, se habrá reducido la dimensión del problema a costa de una pequeña pérdida de información.

Con ello intentamos realizar un análisis exploratorio que nos proporcione cuales son las causas de la variabilidad y las ordenaremos por importancia. Ya que la variabilidad o varianza será la fuente información del PCA.

En nuestro caso, vamos a intentar que las matrices que presentamos para el estudio (Matriz de parámetros físico-químicos, matriz de licor de mezcla y matriz de parámetros operacionales) reduzcan su dimensionalidad mediante la combinación lineal de sus variables más significativas obteniendo así para cada matriz un nuevo grupo de variables que será combinación lineal de las anteriores y que explicarán la mayor parte de la variabilidad muestral, claro está que esto producirá una pequeña pérdida de información.

Así pues, como nuestro objetivo es reducir la dimensionalidad del problema y partimos de un número v de variables observadas

La introducción de la matriz de cálculo en el paquete de cálculo estadístico se realiza colocando todas las observaciones juntas como si se tratara de una sola planta depuradora.

De esta manera se realiza el análisis obteniendo las componentes principales y el peso de las variables estudiadas en cada una de esas componen Reactivos para la realización de la técnica FISH

A continuación se describen los reactivos necesarios para llevar a cabo la técnica FISH, así como su preparación.



⁹ Harold Hotelling, (Minnesota, septiembre de 1895 – Carolina del Norte, diciembre de 1973)

3.6.4 Análisis computacional PCA.

Por su parte para el estudio de componentes principales hemos empleado la aplicación SPSS (versión 19) un software informático que presenta multitud de herramientas para el tratamiento estadístico de datos.

La matriz transformada que se ha presentado con anterioridad se introduce mediante una hoja de cálculo convencional y posteriormente se le aplica la reducción de dimensionalidad mediante un PCA.

Las salidas que el programa proporciona son:

- La media de adecuación muestral de Kaiser-Meyer-Olkin y la prueba de esfericidad de Bartlett.
- Las tablas de covarianza y correlación de la anti-imagen.
- La tabla de comunalidades.
- La tabla de varianza total explicada de cada componente principal.
- El gráfico de sedimentación.
- La matriz de componentes y la de componentes rotados.
- La matriz de transformación de las componentes.
- Y el gráfico del espacio rotado.

Vamos a ir explicando detenidamente cada uno de estas salidas de resultados.

3.6.4.1 Media de adecuación muestral de Kaiser-Meyer-Olkin.

La medida de adecuación muestral de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) nos indica que la muestra de datos en su conjunto es adecuada dado que este coeficiente oscila entre 0 y 1, de manera que cuanto más cercano se encuentra de 1 más adecuados son los datos.

Se calcula mediante

$$KMO = \frac{\sum \sum_{i \neq j} r_{ji}^2}{\sum \sum_{i \neq j} r_{ji}^2 + \sum \sum_{i \neq j} a_{ji}^2}$$

Ecuación 3-4 Índice de adecuación muestral, KMO.

Así, Kaiser propuso en 1974 el siguiente criterio para decidir sobre la adecuación del análisis factorial de un conjunto de datos:

0,9 < KMO ≤ 1,0 = Excelente adecuación muestral.
0,8 < KMO ≤ 0,9 = Buena adecuación muestral.
0,7 < KMO ≤ 0,8 = Aceptable adecuación muestral.
0,6 < KMO ≤ 0,7 = Regular adecuación muestral.
0,5 < KMO ≤ 0,6 = Mala adecuación muestral.
0,0 < KMO ≤ 0,5 = Adecuación muestral inaceptable.

Tabla 3-15 Media de adecuación muestral Kaiser-Meyer-Olkin.

3.6.4.2 Prueba de esfericidad de Bartlett

Por otro lado, la Prueba de esfericidad de Bartlett intenta probar la hipótesis de que la matriz de correlaciones es o no una matriz identidad (Hipótesis nula, H_0), lo que implicaría un nivel nulo de correlación entre las variables.

Si, como resultado del contraste, no pudiésemos rechazar esta H_0 , y el tamaño de la muestra fuese razonablemente grande, deberíamos reconsiderar la realización de un AF, ya que las variables no están correlacionadas.

El estadístico de contraste del test de Bartlett es:

$$B = - \left(n - 1 - \frac{2p+5}{6} \right) \cdot \ln | R^* |$$

Ecuación 3-5 Estadístico de contraste del test de Bartlett.

Bajo la hipótesis nula resulta $\chi^2_{(p^2 - p)/2}$

donde:

- p , es el número de variables
- $| R^* |$, es el determinante de la matriz de correlaciones muestrales.
 - $H_0: | R^* | = 1$
 - $H_1: | R^* | \neq 1$
- ✓ Si Sig. (p-valor) < 0.05 aceptamos H_0 (hipótesis nula) > se puede aplicar el análisis factorial.
- ✗ Si Sig. (p-valor) > 0.05 rechazamos H_0 > no se puede aplicar el análisis factorial.

3.6.4.3 Las tablas de covarianza y correlación de la anti-imagen

La matriz de covarianzas anti-imagen contiene los negativos de las covarianzas parciales y la matriz de correlaciones anti-imagen contiene los coeficientes de correlación parcial cambiados de signo (la correlación entre dos variables se parcializa teniendo en cuenta el resto de variables incluidas en el análisis).

En la diagonal de la matriz de correlaciones anti-imagen se encuentran las medidas de adecuación muestral para cada variable. Si el modelo factorial elegido es adecuado para explicar los datos, los elementos de la diagonal de la matriz de correlaciones anti-imagen deben tener un valor próximo a 1 y el resto de elementos deben ser pequeños.

3.6.4.4 Tabla de comunalidades.

Se denomina "comunalidad" a la proporción de la varianza explicada por los factores comunes en una variable. Estudiando las comunalidades podemos saber cuáles son las variables peor explicadas por el modelo.

La comunalidad (h^2) es la suma de los pesos factoriales al cuadrado en cada una de las filas.

El Anàlisis Factorial comença els càlculs a partir de lo que se coneix com a matriu reduïda composta per els coeficients de correlació entre les variables i amb les comunalitats en la diagonal.

Com a la comunalitat no se pot saber fins que se coneixen els factors, aquest resulta ser un dels problemes de l'Anàlisis Factorial.

En l'Anàlisis de Components Principals com no suposem l'existència de cap factor comú la comunalitat pren com a valor inicial 1. En els altres mètodes se utilitzen diferents mètodes d'estimar la comunalitat inicial:

- Estimant la comunalitat per la major correlació en la fila i -èsima de la matriu de correlacions.
- Estimant la comunalitat per el quadrat del coeficient de correlació múltiple entre x i les altres variables. (Es el que dona el software SPSS per defecte).
- El promig dels coeficients de correlació d'una variable amb totes les altres.
- Calculant a partir dels dos coeficients de correlació majors d'aquesta variable la següent equació:

$$h^2 = \frac{r_{xy}r_{xz}}{r_{yz}}$$

La comunalitat final de cada variable ve donada per:

$$h^2 = P_{1j}^2 + P_{2j}^2 + \dots + P_{kj}^2$$

Ecuación 3-6 Comunalidad final.

3.6.4.5 *Tabla de varianza total explicada de cada componente principal.*

En la taula de percentatges de varianza explicada se ofereix un llistat dels autovalors de la matriu de varianzas-covarianzas i del percentatge de varianza que representa cada un dels.

Els autovalors expressen la quantitat de la varianza total que està explicada per cada factor; i els percentatges de varianza explicada associats a cada factor se obtenen dividint el corresponent autovalor per la suma dels autovalors (la qual coincideix amb el nombre de variables).

Per defecte, se extrauen tants factors com autovalors majors que 1 té la matriu analitzada.

La taula mostra també, per cada factor amb autovalor major que 1, la suma dels saturacions al quadrat. Les sumes dels quadrats de la columna Total (que coincideix amb els autovalors quan se utilitza el mètode components principals, però no quan se utilitzen altres mètodes d'extracció), poden ajudar-nos a determinar el nombre idoni de factors.

La información de esta tabla puede utilizarse para tomar una decisión sobre el número idóneo de factores que deben extraerse dependiendo del porcentaje de variabilidad que se quiera explicar.

3.6.4.6 *El gráfico de sedimentación*

También llamado prueba de sedimentación de Cattell o “Scree-test” (Cattell 1966; Cattell & Vogelmann 1977), muestra una representación gráfica de la magnitud de los autovalores. El corte en la tendencia descendente sirve de regla para la determinación del número óptimo de factores que deben estar presentes en la solución.

Siempre se muestra la representación de los autovalores de la matriz de correlaciones (o de covarianzas) originales, independientemente del método de extracción seleccionado.

3.6.4.7 *La matriz de componentes y la de componentes rotados.*

La rotación de los factores es una herramienta importante para interpretarlos. La rotación significa un cambio de los ejes de referencia sobre el origen hasta que se alcanza otra posición. El efecto de la rotación es redistribuir la varianza para obtener un patrón de factores con mayor significado.

La rotación que se ha utilizado en la presente investigación se denomina VARIMAX (Kaiser 1958). El criterio de rotación VARIMAX¹⁰ se centra en simplificar al máximo los vectores columna de la matriz de factores. La simplificación máxima se alcanza cuando existen ceros y unos en una columna.

Este método maximiza la suma de varianzas de las cargas requeridas de la matriz de factores. La rotación VARIMAX es la que permite obtener unas cargas más extremas (cerca de -1 o $+1$) y otras cargas cercanas a 0 .

El interés de esta rotación es que permite interpretar los factores más fácilmente, al indicar una asociación positiva o negativa clara entre la variable y el factor (o una ausencia de asociación si el valor está cercano a 0) mostrándose, pues, la forma más clara de separar los factores.

La matriz de componentes recoge las componentes principales con el peso que le corresponde de las variables estudiadas, de manera que las componentes principales son combinaciones variables.

De igual manera la matriz de componentes rotados presenta las componentes principales rotadas haciendo que se minimicen al máximo los valores de correlación de las variables.

¹⁰ Desarrollado por Kaiser en 1985.



3.6.4.8 *Matriz de transformación de las componentes*

La matriz de transformación de los componentes muestra cuales han sido los parámetros que han realizado la rotación.

En nuestro caso en concreto, los valores que aparecen en la matriz corresponden a los proporcionados por la rotación VARIMAX.

3.6.4.9 *Gráfica del espacio rotado*

El gráfico del espacio rotado muestra las variables situadas en el espacio generado por las componentes principales.

Como las componentes principales que obtenemos pueden ser de dimensión mayor que 3, solo se representan las tres primeras ya que no somos capaces de ver representas más dimensiones. Limitaciones del ser humano.

Generalmente y para una mejor comprensión, se escogen solo dos de las componentes principales rotadas y se representan en un espacio bidimensional que proporciona la información de cómo las variables se agrupan con respecto al resto de variables y se sitúan respecto a los ejes.

En nuestro caso, la variable que deseamos explicar (variable G06 o Gordonia) es una de las muchas que hemos introducido en el análisis exploratorio de componentes principales y tendremos que realizar un estudio detallado posteriormente para inferir su relación significativa o no con el resto de las variables.

4 Resultados y discusión

Los resultados y discusión que se presentan a continuación se refieren a la realización de las hibridaciones con la técnica FISH que se realizó de las muestras del licor de mezcla de las EDAR Quart-Benáger y de las dos líneas de la EDAR Castellón de la Plana, durante un periodo de 13 meses.

Las hibridaciones se realizaron con el fin de determinar y cuantificar la cantidad de bacterias del género *Gordonia*.

Con las observaciones con microscopía de epifluorescencia se cuantificaron mediante el método subjetivo de Eikelboom la cantidad de filamentos del género *Gordonia* presentes en el fango.

Con ello se pudo realizar un estudio estadístico de carácter exploratorio mediante un análisis de componentes principales (PCA) integrando en el los parámetros físico-químicos, operacionales y de licor de mezcla de los reactores de fangos activos.

Las tablas con el resto de variables se recogen en el apartado de anexos y en este apartado solamente hemos incluido las variables que forman parte del estudio estadístico.

La discriminación de qué variables formarían parte del estudio ha sido realizada mediante diversos criterios que responden a:

- La eliminación en el análisis estadístico de aquellas variables que no presentaban relación con la población de *Gordonia*.
- Los estudios preliminares de PCA en los que podemos ver como existen variables que presentan una significación estadística nula y no aportaban variabilidad al modelo.

En la discusión hemos incluido las referencias bibliográficas encontradas que aluden a los parámetros de estudio y que tuvieron significancia estadística, tanto a nivel del coeficiente de Spearman, como en el PCA.

Seguidamente se presentan de forma detallada los resultados obtenidos en el trabajo final de master.

4.1 Comparación de los resultados de las observaciones entre técnicas convencionales y FISH.

Seguidamente en la tabla 4-1, tabla 4-2 y tabla 4-3 hemos recogido los resultados que se obtuvieron por técnica convencional por parte del laboratorio de Química y Microbiología del Agua.

Como se puede apreciar en las figura 4-1, figura 4-2 y figura 4-3 existen diferencias puntuales entre las observaciones que fueron realizadas por técnicas convencionales y las que hemos realizando empleando la técnica FISH.

Esto viene a decir que los mycolata que fueron identificados por técnicas convencionales se trataban en su inmensa mayoría de *Gordonia*. Y las escasas diferencias en las observaciones las achacamos más a diferencias de criterio en la observación que a variaciones poblacionales en sí mismo.

Además, hay que tener en cuenta que el nivel de hibridación se da no solo por el hecho de la existencia de bacterias del género, tipo o especie adecuadas, si no por el número de ribosomas que contenga las células en el momento de la hibridación ya que el ARN que será hibridado es el ARN ribosómico. Este número está determinado al nivel de actividad de las bacterias.

Tabla 4-1 Comparativa entre observaciones realizadas con FISH y mediante técnicas convencionales. Quart-Benager.

	04/12/2008	17/12/2008	14/01/2009	28/01/2009	11/02/2009	25/02/2009	11/03/2009	25/03/2009	07/04/2009	22/04/2009	06/05/2009	20/05/2009	03/06/2009	17/06/2009	01/07/2009	15/07/2009	09/09/2009	23/09/2009	07/10/2009	21/10/2009	04/11/2009	18/11/2009	16/12/2009	29/12/2009	
FISH	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CONVE N.	5	5	5	5	5	5	5	4- 5	5	4- 5	5	4	4- 5	4	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	

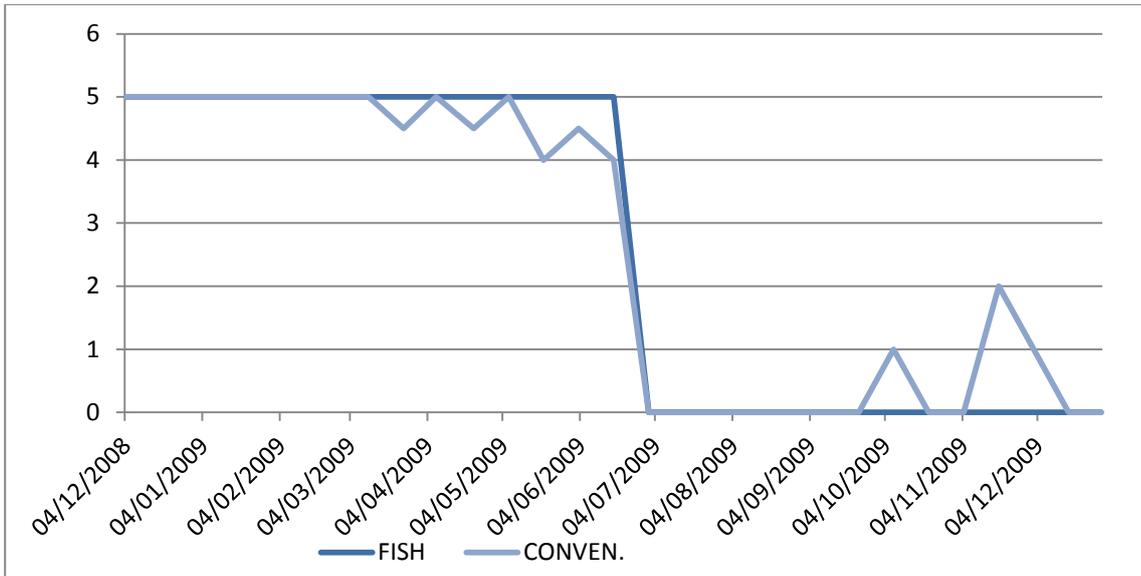


Figura 4-1 Comparativa entre los resultados mediante FISH y técnicas convencionales. Quart-Benager.

Tabla 4-2 Comparativa entre observaciones realizadas con FISH y mediante técnicas convencionales. Castellón Línea 1.

	03/12/2008	17/12/2008	14/01/2009	28/01/2009	11/02/2009	25/02/2009	11/03/2009	25/03/2009	22/04/2009	06/05/2009	20/05/2009	03/06/2009	17/06/2009	01/07/2009	15/07/2009	09/09/2009	23/09/2009	07/10/2009	21/10/2009	04/11/2009	18/11/2009	16/12/2009	28/12/2009
FISH	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4	4	3	4	4	3	4	5	5
CONV	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4-5	4-5	4	3	4	?	?	?	?	?	?	?	5	5

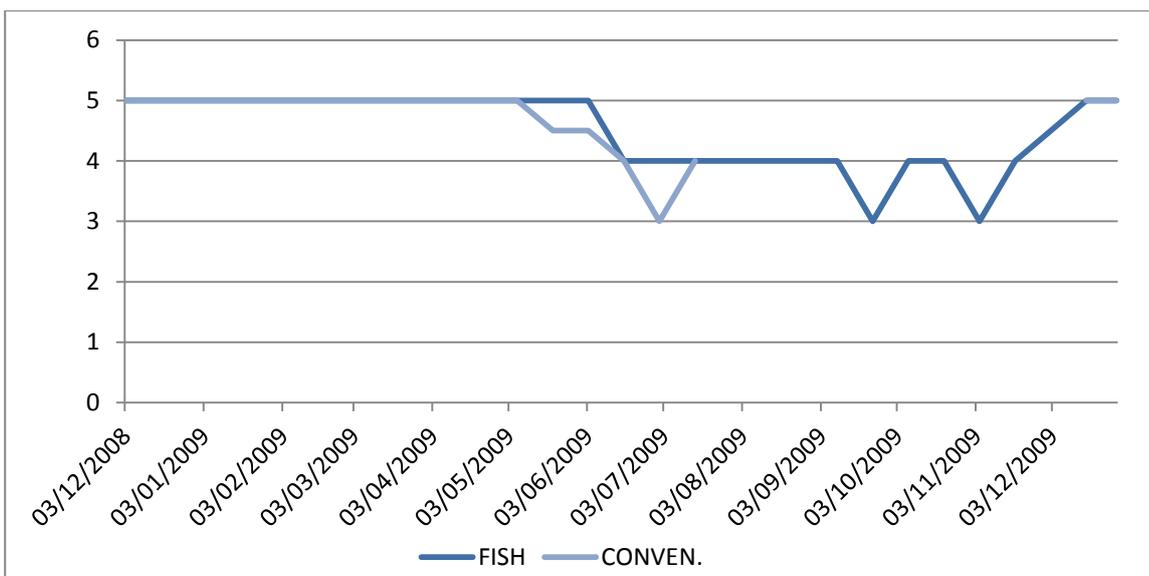


Figura 4-2 Comparativa entre los resultados mediante FISH y técnicas convencionales. Castellón Línea 1.

Tabla 4-3 Comparativa entre observaciones realizadas con FISH y mediante técnicas convencionales. Castellón Línea 2.

	03/12/2008	17/12/2008	14/01/2009	28/01/2009	11/02/2009	25/02/2009	11/03/2009	25/03/2009	22/04/2009	06/05/2009	20/05/2009	03/06/2009	17/06/2009	01/07/2009	15/07/2009	09/09/2009	23/09/2009	07/10/2009	21/10/2009	04/11/2009	18/11/2009	16/12/2009	28/12/2009
FISH	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	4	4	4	4	5	5	5	5	4	5	5
CONV.	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4-5	3	3	4	?	?	5	5	5	5	5	5

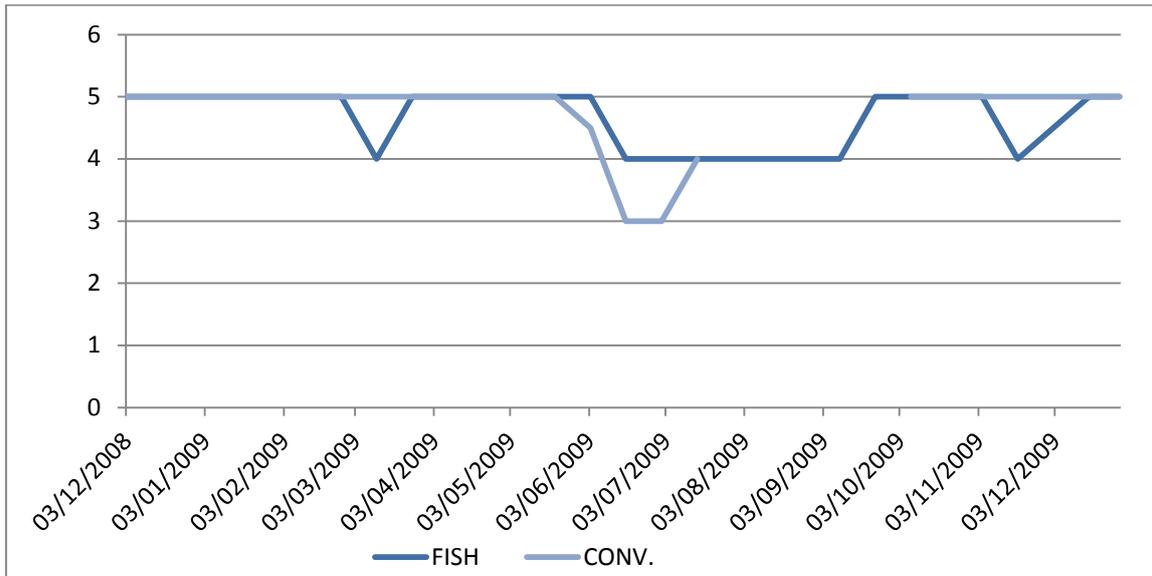


Figura 4-3 Comparativa entre los resultados mediante FISH y técnicas convencionales. Castellón Línea 2.

4.2 Físico-Químicos

Seguidamente en la tabla 4-4, tabla 4-5 y tabla 4-6 se presentan los valores de la media, mediana, máximo, mínimo y la desviación típica de las variables físico-químicas empleadas en el estudio.

Además se incluyen las abreviaturas empleadas y las unidades en las que se expresan dichas variables.

En el apartado III de los Anexos se incluyen las gráficas comparativas de las variables que se han encontrado significativas y del nivel de *Gordonia*.

Tabla 4-4 Parámetros Físico-Químicos de Quart-Benager

PARÁMETROS	ABREVIATURAS	Unidades	MEDIA	MEDIANA	MAX.	MIN.	DESV
pDQOs3	pDQOs3	%	48.84	49.00	61.00	37.00	4.99
DQO/DBO	DQOxDBO		1.75	1.72	2.33	1.43	0.20
Carga Nitrógeno total	CNT	Kg NT/Kg SSVLM.d	0.05	0.04	0.10	0.03	0.02
Carga Nitrógeno total soluble	CNTs	Kg NTs/Kg SSVLM.d	0.04	0.03	0.09	0.02	0.02
N-NH4	N_NH4_af	mg/L	40.26	42.40	62.20	24.00	12.11
porcentaje N-NH4	%N-NH4	%	75.77	75.86	88.27	66.13	6.24
Carga N-NH4	CN-NH4	Kg N_NH4/Kg SSVLM.d	0.04	0.03	0.08	0.02	0.01
Carga N-org soluble	CN_orgs	g N_orgs/Kg SSVLM.d	4.61	4.22	11.27	0.00	3.79
Carga fósforo total	CPT	g PT/Kg SSVLM.d	4.79	3.95	8.99	1.81	2.04
Carga fósforo total soluble	CPTs	g PTs/Kg SSVLM.d	2.60	2.50	5.70	0.72	1.33
P-PO4 afl.	P_PO4_af	mg/L	2.52	2.30	4.80	1.00	1.22
Porcentaje P-PO4 afl.	%P_PO4_af	%	47.01	46.74	80.56	32.26	10.95
Carga P-PO4	CP_PO4	g P_PO4/Kg SSVLM.d	2.31	1.81	5.37	0.72	1.27
Carga de P-org soluble	CP_orgs	g P_orgs/Kg SSVLM.d	0.24	0.21	0.75	0.00	0.16
DBO5/NKT	DBO5/NKT		4.54	4.44	7.93	2.65	1.14
DBO5/PT	DBO5/PT		48.76	50.00	97.87	27.27	13.97
T. aniónicos afl.	Tensani_af	mg/L	3.27	3.06	7.50	1.23	1.82
Carga tensioactivos aniónicos	CTA	g TA/Kg SSVLM.d	3.09	2.69	10.20	0.87	2.18
Carbohidratos	CARBO	mg/L	8.67	8.00	15.00	5.00	3.00
Carga Carbohidratos	CCARBO	g Carbo/Kg SSVLM.d	8.37	6.94	19.34	3.74	4.17
Proteínas	Prote	mg/L	62.33	58.00	111.00	30.00	21.31
Carga Proteínas	Cprote	g Prote/Kg SSVLM.d	59.93	51.03	140.51	25.17	29.18
Aceites y grasas	AG	mg/L	14.92	15.00	30.00	4.00	6.88
Carga Aceites y grasas	CAG	g AG/Kg SSVLM.d	14.22	11.48	31.65	3.98	7.77
Ácidos Grasos Volátiles	AGV	mg/L	27.78	9.90	169.00	0.00	42.05
Carga Ácidos Grasos Volátiles	CAGV	g AGV/Kg SSVLM.d	31.32	8.10	297.20	0.00	62.44

Tabla 4-5 Parámetros Físico-Químicos Castellón línea 1

PARÁMETROS	ABREVIATURAS	Unidades	MEDIA	MEDIANA	MAX.	MIN.	DESV
pDQOs3	%DQOs3	%	44.13	43.46	55.25	35.51	5.66
DQO/DBO	DQOxDBO		2.14	2.09	3.13	1.63	0.38
Carga Nitrógeno total	CNT	Kg NT/Kg SSVLM.d	0.09	0.09	0.15	0.04	0.02
Carga Nitrógeno total soluble	CNTs	Kg NTs/Kg SSVLM.d	0.08	0.08	0.14	0.04	0.02
N_NH4_af	N_NH4_af	mg/L	46.57	46.00	66.00	32.00	7.60
porcentaje N-NH4	%N-NH4	%	80.07	80.00	91.30	72.86	5.13
Carga N-NH4	CN-NH4	Kg N_NH4/Kg SSVLM.d	0.07	0.07	0.12	0.03	0.02
Carga N-org soluble	CN_orgs	g N_orgs/Kg SSVLM.d	6.99	4.96	22.06	0.00	6.33
Carga fósforo total	CPT	g PT/Kg SSVLM.d	16.39	16.32	36.77	5.94	6.22
Carga fósforo total soluble	CPTs	g PTs/Kg SSVLM.d	13.82	12.86	34.93	4.56	5.95
P-PO4 afl.	P_PO4_af	mg/L	7.78	6.87	16.35	3.92	3.01
Porcentaje P-PO4 afl	%P_PO4_af	%	74.47	76.94	96.89	50.54	10.73
Carga P-PO4	CP_PO4	g P_PO4/Kg SSVLM.d	12.11	10.89	30.06	4.16	4.98
Carga P-org soluble	CP_orgs	g P_orgs/Kg SSVLM.d	1.71	0.96	5.54	0.00	1.62
DBO5/NKT	DBO5/NKT		3.07	3.11	4.67	1.64	0.77
DQOs/PTs	DQOs/PTs		20.33	19.20	37.74	9.64	6.65
Tens. aniónicos afl.	TA_af	mg/L	4.53	4.50	7.00	1.50	1.13
Carga tensioactivos aniónicos	CTA	g TA/Kg SSVLM.d	7.12	7.31	9.98	1.59	1.81
Carbohidratos	CARBO	mg/L	7.05	6.50	12.00	5.00	1.79
Carga Carbohidratos	CCARBO	g Carbo/Kg SSVLM.d	11.28	10.49	22.06	6.67	3.59
Proteínas	Prote	mg/L	56.05	53.00	80.00	40.00	11.20
Carga Proteínas	Cprote	g Prote/Kg SSVLM.d	89.98	88.77	147.09	46.93	24.02
Aceites y grasas	AG	mg/L	16.09	17.00	27.00	4.00	6.10
Carga Aceites y grasas	CAG	g AG/Kg SSVLM.d	25.51	26.02	49.61	5.33	9.87
Ácidos Grasos Volátiles	AGV	mg/L	26.13	18.20	79.60	0.00	27.11
Carga Ácidos Grasos Volátiles	CAGV	g AGV/Kg SSVLM.d	40.55	32.18	127.23	0.00	41.36

Tabla 4-6 Parámetros Físico-Químicos Castellón línea 2

PARÁMETROS	ABREVIATURAS	Unidades	MEDIA	MEDIANA	MAX.	MIN.	DESV
pDQOs3	%DQOs3	%	38.58	37.22	53.22	25.68	9.20
DQO/DBO	DQO/DBO		2.15	2.04	3.28	1.23	0.56
Carga Nitrógeno total	CNT	Kg NT/Kg SSVLM.d	0.09	0.08	0.16	0.05	0.03
Carga Nitrógeno total soluble	CNTs	Kg NTs/Kg SSVLM.d	0.08	0.07	0.15	0.03	0.03
N-NH4 afl.	N_NH4_af	mg/L	45.43	45.00	66.00	32.00	9.53
porcentaje N-NH4	%N-NH4	%	74.41	75.00	86.05	52.17	8.10
Carga N-NH4	CN-NH4	Kg N_NH4/Kg SSVLM.d	0.07	0.07	0.12	0.03	0.02
Carga N-org soluble	CN_orgs	g N_orgs/Kg SSVLM.d	8.25	4.98	28.77	0.00	8.10
Carga fósforo total	CPT	g PT/Kg SSVLM.d	17.76	14.72	34.94	7.41	8.03
Carga fósforo total soluble	CPTs	g PTs/Kg SSVLM.d	12.49	11.77	24.66	5.55	4.66
P-PO4 afl.	P_PO4_af	mg/L	7.87	7.85	17.00	3.27	3.27
Porcentaje P-PO4 afl	%P_PO4_af	%	68.96	69.57	98.10	29.54	17.58
Carga P-PO4	CP_PO4	g P_PO4/Kg SSVLM.d	11.57	11.22	19.49	4.93	4.25
Carga P-org soluble	CPorgs	g P_orgs/Kg SSVLM.d	0.92	0.62	5.17	0.00	1.10
DBO5/NKT	DBO5/NKT		3.20	2.91	6.67	1.48	1.17
DBO5/PT	DBO/PT		18.27	16.67	40.43	7.86	8.38
Tens. aniónicos afl.	TA_af	mg/L	4.53	4.30	12.00	1.10	2.29
Carga tensioactivos aniónicos	CTA	g TA/Kg SSVLM.d	6.59	6.14	12.55	1.38	2.70
Carbohidratos	CARBO	mg/L	6.52	7.00	10.00	4.00	1.68
Carga Carbohidratos	CCARBO	g Carbo/Kg SSVLM.d	9.97	9.81	19.39	5.23	3.69
Proteínas	Prote	mg/L	55.30	52.00	95.00	38.00	13.53
Carga Proteínas	Cprote	g Prote/Kg SSVLM.d	85.20	86.57	153.20	41.25	30.45
Aceites y grasas	AG	mg/L	20.70	21.00	37.00	7.00	8.01
Carga Aceites y grasas	CAG	g AG/Kg SSVLM.d	29.84	30.47	51.40	14.09	9.99
Ácidos Grasos Volátiles	AGV	mg/L	29.84	29.00	78.70	0.00	24.28
Carga Ácidos Grasos Volátiles	CAGV	g AGV/Kg SSVLM.d	44.54	48.97	107.08	0.00	34.57

4.2.1 Coeficiente de Spearman. Físico-Químicos.

Tabla 4-7 Coeficientes de Spearman para variables Físico-Químicas

	Variables Físico-Químicas								
	pDQOs	DQOxDBO	CNT	CNTs	N_NH4_af	%N-NH4	CN-NH4	N_orgs_af	CPT
Coeficiente de correlación	.099	-.077	,280*	,321**	,531**	-.193	,254*	,477**	.234
Sig. (bilateral)	.413	.533	.019	.007	.000	.110	.034	.000	.051
N	70	68	70	70	70	70	70	70	70

	Variables Físico-Químicas								
	CPT	CPTs	P_PO4_af	%P_PO4_af	CP_PO4	Porgs_af	DBO5/N KT	DBO/P T	Tensani_af
Coeficiente de correlación	.234	,274*	,357**	,257*	,303*	.201	.015	-.024	,287*
Sig. (bilateral)	.051	.022	.003	.033	.011	.097	.900	.845	.017
N	70	70	69	69	69	69	68	68	69

	Variables Físico-Químicas								
	CTA	CARBO	CCARBO	Prote	Cprote	AG	CAG	AGV	CAGV
Coeficiente de correlación	.159	,375**	,288*	,446**	,323**	,610**	,528**	.174	.127
Sig. (bilateral)	.192	.002	.016	.000	.007	.000	.000	.152	.297
N	69	69	69	69	69	69	69	69	69

En la tabla 4-7, se puede ver que el coeficiente de correlación de Spearman para ciertas variables está marcado con dos asteriscos (** $P < 0.01$), otros con solo uno (* $P < 0.05$) y algunos no presentan dichos asteriscos. Eso se debe al nivel de significación bilateral que alcanza cada una de las variables en este caso en su correlación con la variable G06 o *Gordonia*. Es evidente, que la primera celda presenta un coeficiente de correlación igual a la unidad ya que la cada variable con si misma presenta dicha correlación. El resto de variables oscilará entre 1 y 0. Siendo 1 el valor con mayor correlación y 0 cuando la correlación es nula.

En el caso de las variables Físico-Químicas se puede ver como solo 3 variables presentan un coeficiente de correlación con dos asteriscos ($P < 0.01$), son:

- CNTs**
- N_NH4_af**
- N_orgs_af**
- P_PO4_af**
- CARBO**
- Prote**
- CProte**
- AG**
- CAG**

Mientras que las variables que presentan un solo asterisco ($P < 0.05$), son:

- CNT*
- CN_NH4*
- CPTs*
- %P_PO4_af*
- CP_PO4*
- Porgs_af*
- Tensani_al*
- CCARBO*

Entre las variables que presentan un coeficiente de correlación mayor destacan las sustancias que tienen presentes los nutrientes como el nitrógeno (CNTs, N_NH4_af, N_orgs_af y las Proteínas que son fuente de nitrógeno)

Más adelante tendremos la ocasión de ver de manera gráfica como se plasma este coeficiente de correlación. De momento prestaremos una mayor atención a estas variables en el PCA (Análisis de Componentes Principales)

E Incluso es posible que parte de las variables sean eliminadas del estudio al no aportar nueva información al mismo, es decir, las variables que están tan íntimamente relacionadas como CARBO (Carbohidratos) y CCARBO (Carga de carbohidratos) es muy posible que no aporten nuevos datos al estudio e incluirlas las dos sea una fuente más de complicación del problema, en lugar de solventarlo. Con lo que este tipo de redundancias se elimina y se deja solo una de las dos.

4.2.2 Análisis de componentes principales. Físico-Químicos

Seguidamente se muestran y comentan los resultados obtenidos con el SPSS.

Como se puede observar en la tabla 4-8 que la media de adecuación muestral de KMO se aproxima al valor de 0,7. Ese valor sería más que deseable ya que entraríamos en el rango de adecuación muestral aceptable.

De cualquier manera, nos quedamos en el rango anterior que nos da una clasificación de regular, tal y como puede verse en la tabla 3-15.

Tabla 4-8 KMO y prueba de Bartlett

Medida de adecuación muestral de Kaiser-Meyer-Olkin.		,691
Prueba de esfericidad de Bartlett	Chi-cuadrado aproximado	1118,479
	gl	91
	Sig.	,000

El nivel de significación, tal y como ya hemos indicado en el punto 3.6.4.2, es muy inferior a 0,05 con lo que se acepta la hipótesis nula y con ello se puede aplicar el análisis factorial.

Como podemos ver en la tabla 4-9 los porcentajes de varianza que cada una de las componentes principales es capaz de explicar, y que tenemos en cuenta, se sitúa en las columnas agrupadas bajo el título “Suma de las saturaciones al cuadrado de la rotación” ya que lo que vamos a tomar en cuenta es el valor dado por la matriz de las componentes rotadas. El porcentaje acumulado de la varianza explicada alcanza un valor de 63.53% un valor aceptable para considerar como necesarias solo las dos primeras componentes principales.

Tabla 4-9 Varianza total explicada. Físico-químicas

Componente	Autovalores iniciales			Sumas de las saturaciones al cuadrado de la extracción			Suma de las saturaciones al cuadrado de la rotación		
	Total	% de la varianza	% acumulado	Total	% de la varianza	% acumulado	Total	% de la varianza	% acumulado
1	5,900	42,143	42,143	5,900	42,143	42,143	5,566	39,758	39,758
2	2,994	21,388	63,532	2,994	21,388	63,532	3,328	23,774	63,532
3	1,069	7,634	71,165						
4	,911	6,508	77,673						
5	,691	4,939	82,612						
6	,642	4,589	87,201						
7	,474	3,384	90,585						
8	,362	2,585	93,169						
9	,324	2,311	95,481						
10	,290	2,074	97,554						
11	,223	1,592	99,146						
12	,116	,825	99,971						
13	,003	,024	99,995						
14	,001	,005	100,000						

Método de extracción: Análisis de Componentes principales.

Como puede apreciarse en la tabla 4-9, el porcentaje de la varianza explicada para cada una de las componentes principales es de un 39,75% y de un 23,77% para la primera y segunda componente principal respectivamente.

El porcentaje acumulado del 63,53% es suficiente para poder explicar con solo dos ejes gran parte de la variabilidad muestral.

Esa variabilidad se adjudica a cada una de las componentes principales según muestra la tabla 4-10 y la figura 4-4 en la que las variables se distribuyen en el espacio bidimensional según su peso respecto a los ejes.

Tabla 4-10 Matriz de componentes rotados

Variables	Componentes principales	
	1	2
CPTs	,935	,250
CP_PO4	,924	,251
CN-NH4	,856	,261
DBO/PT	-,853	,204
CNTs	,831	,376
DBO5/NKT	-,720	,333
CP_orgs	,601	,167
pDQOs	-,525	,328
Prote	-,069	,816
CARBO	-,316	,740
AG	,205	,723
CN_orgs	,318	,689
G06	,530	,585
AGV	,061	,391

Método de extracción: Análisis de componentes principales.

Método de rotación: Normalización Varimax con Kaiser.

a. La rotación ha convergido en 3 iteraciones.

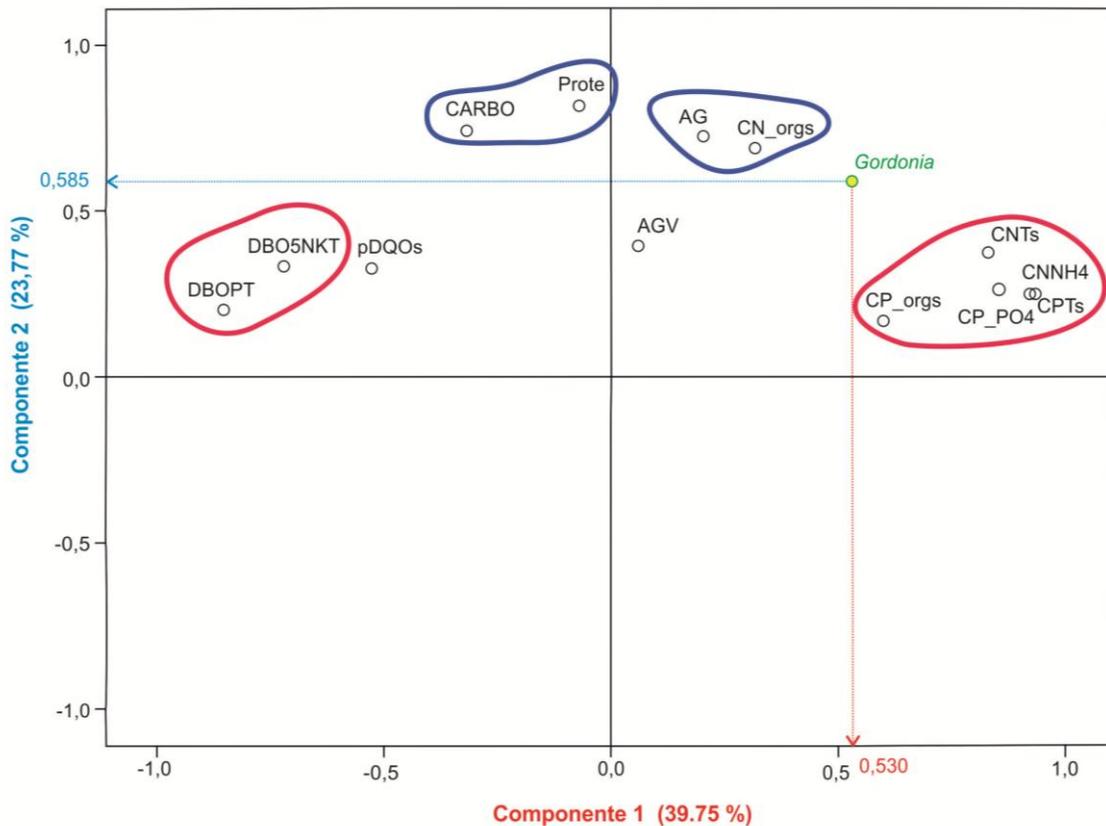


Figura 4-4 Gráfico de componentes en espacio rotado. Físico-Químicos.

Como podemos apreciar en la figura 4-4, las variables que se han agrupado en el entorno de nuestra variable estudiada son;

- Respecto al eje de la primera componente: CNTs, CP_PO4, CNNH4, CPTs, CP_orgs, DBO5NKT y DBOPT.
- Respecto al eje de la segunda componente: AG, CN_orgs, Prote y CARBO.

No se mostrarán todas las gráficas que sí se recogen en el apartado anexos de este trabajo ya que no todas presentan una relación tan clara.

Seguidamente se presentan solo algunas en las que hemos encontrado una fuerte relación significativa entre la evolución de la población de *Gordonia* y la variable estudiada.

4.2.3 Compuestos del nitrógeno

Como se ha podido constatar en el PCA realizado sobre las variables físico-químicas, los compuestos de nitrógeno presentan altos niveles en la matriz de componentes rotados indicando la fuerte variabilidad que producen frente al resto de variables tal y como vemos en la tabla 4-10. Siendo destacable los valores de CN-NH4 (0.856), CNTs (0.831), Proteínas (0.816) y CN-orgs (0.689).

La relación entre los compuestos del nitrógeno y la variable *Gordonia* se produce en nuestro caso de forma positiva siendo que se ha encontrado casos en los que la relación es negativa aunque más débil (Asvaparhanagul et al. 2010). En nuestro trabajo esto queda

reforzado por los coeficientes de correlación de Spearman que poseen los compuestos de nitrógeno estudiados (ver tabla 4-7) y que presentan esta relación positiva.

La producción de PHB, como elemento de reserva y que proporciona a *Gordonia* y una ventaja competitiva para la supervivencia en condiciones en las que los nutrientes son limitantes para el crecimiento bacteriano, se ve incrementada cuando las concentraciones de nitrógeno se reducen. La asimilación de sustrato viene ligada íntimamente a la relación COD/N (en nuestro estudio se representa de manera similar con DBO5/NKT, es decir, la fracción más fácilmente biodegradable de COD/N). Cuando existe una abundancia de sustratos y la relación COD/N alcanza valores próximos a 20 (relación 600/30) se encuentra en el punto de menor producción de PHA. A concentraciones bajas, el nitrógeno, es el elemento limitante, el cual determina la tasa de toma de sustrato y la capacidad de síntesis de PHB, y esta abundancia de sustrato se emplea para el crecimiento más que para la acumulación de polímeros de reserva. Se ha determinado un umbral de COD/N=125 como la mejor relación para la síntesis de PHA y PHB por parte de *Gordonia* ya que su acumulación va ligada a la ausencia de sustrato (COD) (Liu et al. 2013).

La población de *G. amarae* se incrementa cuando el NH₃ en el afluente desciende. La concentración de NH₃ puede verse alterada por otros parámetros como cDBO/nDBO. Así pues, la población de *Gordonia* se ve aumentada al aumentar la relación cDBO/nDBO.

4.2.4 Compuestos del fósforo

Los compuestos del fósforo por su parte se asocian con el nivel de *Gordonia* observado en este trabajo, tal y como muestra la tabla 4-10 la mayor parte de la variabilidad proporcionada por los compuestos del fósforo se concentran en la primera componente principal y en ella destacan de manera especial, CPTs (0.935), CP-PO₄ (0.924) y algo más bajo CP-orgs (0.601).

Las correlaciones de Spearman para estas variables presentan distintos niveles, siendo destacables la presentada por P_PO₄_af (Fósforo en forma de fosfatos del afluente) que presenta un coeficiente de correlación $r=0.357$ con un nivel de significación bilateral $P<0.01$.

Las bacterias producen los biopolímeros como mecanismo de almacenamiento de carbono y energía. Los poliésteres se depositan en forma de gránulos altamente refractivos en las células. La biosíntesis de PHA es generalmente causada por ciertas condiciones de deficiencia (por ejemplo, falta de macroelementos, tales como fósforo, nitrógeno, elementos traza, o la falta de oxígeno) y el exceso de oferta de fuentes de carbono.

Los mecanismos de acumulación de sustancias como PHB y PHA, que se han visto esenciales para la supervivencia de *Gordonia* en condiciones en las que a priori no son competitivas metabólicamente, se producen de igual manera para el fósforo. Se ha constatado en los estudios realizados por Asvapathanagul y colaboradores 2010 que se produce una mayor acumulación de compuestos de reserva (polifosfatos) al final de las fases aerobias y anaerobias, haciendo que los microorganismos acumuladores de PHA sean los predominantes en la comunidad microbiana. El ratio COD/P para el que *Gordonia* acumula menor cantidad de PHB se sitúa en 40 (relación 600/15) (Asvapathanagul et al. 2010).

Gordonia amarae es capaz de obtener fósforo a partir de la hidrólisis del fósforo orgánico por fosfatasa (Kragelund et al. 2007)



4.2.5 Aceites y grasas (AG)

Aceites y grasas ha sido el parámetro físico-químico que ha presentado el valor más elevado en el coeficiente de Spearman con $r=0.610$ ($P<0.01$) mientras que presenta un peso discreto en el PCA con un valor de 0.205. Evidentemente, los aceites y grasas no modifican de gran manera el resto de valores estudiados en el PCA, con salvedad de *Gordonia* y de la DQOs.

La presencia de lípidos en las plantas de tratamiento de agua han sido considerada como favorecedora de los episodios de foaming, tanto en plantas a escala real (Pipes 1978; Forster 1992; Franz & Matsché 1994), como en planta piloto (Bendt et al. 1989). Esto se apoya en el hecho de que las bacterias formadoras de espumas son capaces de consumir sustancias hidrofóbicas (Kurane et al. 1986; Blackall et al. 1991; Khan & Forster 1991; Soddell & Seviour 1990). Se han detectado lipasas y esterases como enzimas extracelulares en *Gordonia amarae* (Kragelund et al. 2007).

El hecho de que las bacterias formadoras de espumas presenten paredes hidrofóbicas les proporciona una ventaja competitiva frente a otras bacterias a la hora de metabolizar sustratos hidrofóbicos, como son las grasas y los aceites (lípidos en general). Las bacterias formadoras de foaming presentan la tendencia natural de agregarse en la superficie de los lípidos y de esta manera se encuentran en contacto íntimo con este sustrato. (Lemmer 1986). De hecho se ha sugerido que las paredes celulares hidrofóbicas de estas bacterias pueden arrastrar de manera efectiva a moléculas hidrofóbicas libres reduciendo así su constante media de saturación (K_s) para los sustratos hidrofóbicos (Soddell 1999; Frigon et al. 2006).

Las bacterias formadoras al poseer paredes hidrofóbicas tienen una ventaja competitiva frente a otras bacterias a la hora de metabolizar sustratos hidrofóbicos, como son las grasas y los aceites (lípidos en general). Las bacterias formadoras de foaming presentan la tendencia natural de agregarse en la superficie de los lípidos y de esta manera se encuentran en contacto íntimo con este sustrato. (Lemmer 1986). De hecho se ha sugerido que las paredes celulares hidrofóbicas de estas bacterias pueden arrastrar de manera efectiva a moléculas hidrofóbicas libres reduciendo así su constante media de saturación (K_s) para los sustratos hidrofóbicos (Soddell 1999; Frigon et al. 2006). Las propiedades superficiales de las células son también importantes para la adsorción de algunas clases de sustratos (lípidos a superficies hidrofóbicas), y pueden también promover la adhesión celular al material flocular.

Los aceites y grasas son considerados como sustratos lentamente biodegradables (o SDS por sus siglas en inglés, Slowly Degradable Substrates) y forma parte de la fracción de DQO lentamente biodegradable.

La hidrólisis de los lípidos por parte del género *Gordonia* y otros como *Miclothrix* o *Skermania*, los transforma en glicerol y ácido oleico de más fácil asimilación mediante la excreción al medio de enzimas como lipasas y esterases. (Nielsen et al. 2010)

Se ha desarrollado un modelo que conceptualiza el fango activo como una colección de poblaciones no competitivas (Frigon et al. 2006) el cual se puede parametrizar como el modelo ASM3 (Gujer et al. 1999), y se ha analizado el espectro de población desde los asimiladores de SDS (Sustrato Lentamente Biodegradable) a los especialistas del RDS (Sustrato Rápidamente Biodegradable) y se ha visto que la constante de "hidrólisis" para los

especialistas de SDS es el parámetro más sensible del modelo. Es el doble de sensible que el parámetro de la tasa de crecimiento de los especialistas en SDS, el cual es el segundo parámetro más sensible del modelo. Esto sugiere que la reacción de hidrólisis es el factor determinante en la variación estacional de la población de bacterias formadoras de espumas biológicas (Frigon et al. 2006).

Existen trabajos en los que se ha demostrado que *Gordonia amarae*, metaboliza en cultivo puro los siguientes ácidos grasos de cadena corta: acético, butírico y propiónico (Soddell & Seviour 1998). En estudios del metabolismo "in situ" de *Gordonia amarae* se ha comprobado que metaboliza ácidos grasos de cadena larga como palmítico (Carr, Eales & Seviour 2006). También se ha visto que es capaz de metabolizar en ensayos de laboratorio aceite de girasol y de oliva (Kragelund et al. 2007).

Pese a no haber podido encontrar en la bibliografía los umbrales de crecimiento de *Gordonia* respecto a los niveles de SDS (o aceites y grasas), nosotros hemos determinado una frontera la cual situamos en el umbral de los 10 mg/L.

Pese a todo, creemos que la cantidad de aceites y grasas no determina la población de *Gordonia* de manera aislada tal y como hemos tenido la ocasión de comprobar en otros estudios (Frigon et al. 2006), sino que actúa de manera conjunta con otros factores y principalmente con la temperatura.

De hecho, se ha comprobado que los sistemas de control de Mycolata mediante la eliminación de aceites y grasas ha funcionado pero no en todos los casos. Las Mycolata son capaces de almacenar gran cantidad de PHA con lo que son capaces de sobrevivir algún tiempo en las espumas (Nielsen et al. 2010), también pueden almacenar polifosfatos (Kragelund et al. 2007). Las bacterias producen PHA como mecanismo de almacenamiento de carbono y energía. Los poliésteres se depositan en forma de gránulos altamente refractivos en las células.

La biosíntesis de PHA es generalmente causada por ciertas condiciones de deficiencia (por ejemplo, falta de nutrientes, como fósforo, nitrógeno, elementos traza, o la falta de oxígeno) y el exceso de carbono orgánico. La capacidad de almacenar intracelularmente compuestos orgánicos como reservas de carbono y energía puede resultar especialmente ventajoso en condiciones de deficiencia de nutrientes como se dan en la mayoría de sistemas con fangos activos (Martins et al. 2004).

4.2.6 Carbohidratos

Se ha observado un coeficiente de linealidad de Spearman para los carbohidratos de $r=0.374$ y elevada significación bilateral ($P<0.01$) como refleja la tabla 4-7, sin embargo el nivel de varianza en la primera componente principal aportado por los carbohidratos es bajo (-0.069) tal y como puede verse en la tabla 4-10.

En general, no hemos encontrado en la bibliografía disponible referencias a los carbohidratos, aunque *Gordonia amarae* producen enzimas extracelulares como la glucuronidasa, que hidrolizan los carbohidratos presentes en las sustancias extracelulares poliméricas (EPS) (Kragelund et al. 2007).



4.2.7 Demanda Química de Oxígeno soluble (DQOs)

Los datos presentados en la tabla 4-7 muestran que el coeficiente de regresión de Spearman ($r=0.099$) muestra una relación muy poco significativa con respecto a *Gordonia*. Se aprecia que la variabilidad aportada por la DQOs en el análisis de componentes principales es de -0.525.

No se han encontrado estudios en la bibliografía disponible en los que se relacione el nivel de desarrollo de filamentos de *Gordonia* con la DQO.

4.3 Licor de mezcla

Tal como hemos indicado en el apartado 4.2, a continuación se detallan los valores medios, máximos, mínimos y desviaciones típicas de las variables medidas en el licor de mezcla.

En la tabla 4-11, tabla 4-12 y tabla 4-13 se muestra la media, el máximo y mínimo y la desviación típica de cada una de las variables de licor de mezcla empleadas.

En el apartado III de los Anexos se incluyen las gráficas comparativas de las variables que se han encontrado significativas y del nivel de *Gordonia*.

Tabla 4-11 Valores de licor de mezcla Quart-Benager

Variable	Unidades	media	max	mini	desv
pH		7.44	7.79	7.05	0.18
Conductividad	μS/cm	2041	2740	1330	424
S.S.L.M	(mg/L)	2460	3120	1790	386
S.S.V.L.M.	(mg/L)	1947	2498	1455	305
S.S.V.L.M.	(%)	79	87	68	3
IVFD	(mL/g)	119	167	59	27
NTLM	(mg/L)	135.38	216.00	87.20	36.10
PTLM	(mg/L)	56.86	74.80	29.20	11.23
DQO SSLM	(mg/L)	2682	3291	1631	426
temperatura	°C	21	14	29	4

Tabla 4-12 Valores licor de mezcla Castellón línea 1

Variables	Unidades	media	max	mini	desv
pH		7.17	7.51	6.65	0.20
Conductividad	μS/cm	2968	4850	1875	761
SSLM	(mg/L)	4055	6240	2640	1048
S.S.V.L.M.	(mg/L)	2953	4550	1840	758
S.S.V.L.M.	(%)	72	78	64	3
IVFD	(mL/g)	109	161	81	20
NTLM	(mg/L)	157.11	75.40	61.34	157.11
PTLM	(mg/L)	176.89	95.00	45.50	176.89
DQO SSLM	(mg/L)	4190	2661	1186	4190
temperatura	°C	22	29	16	4

Tabla 4-13 Valores licor de mezcla Castellón línea 2

Variable	Unidades	media	max	mini	desv
pH		7.20	7.60	6.85	0.21
Conductividad	μS/cm	2906	4840	1895	691
SSLM	(mg/L)	4127	6800	2460	1157
S.S.V.L.M.	(mg/L)	2997	4920	1490	890
S.S.V.L.M.	(%)	72	81	61	5
IVFD	(mL/g)	109	160	64	29
NTLM	(mg/L)	162.17	59.60	89.13	162.17
PTLM	(mg/L)	170.16	76.70	63.79	170.16
DQO SSLM	(mg/L)	4262	1985	1294	4262
temperatura	°C	22	29	15	4

4.3.1 Coeficiente de Spearman. Licor de mezcla.

De igual manera con las variables del licor de mezcla tenemos la tabla 4-14 se recogen los valores del coeficiente de correlación de Spearman.

Tabla 4-14 Coeficientes de Spearman para variables del licor de mezcla

	Variables licor de mezcla			
	pHLM	CondLM μ S/cm	SSLM	SSVLM
Coefficiente de correlación	-,333**	,575**	,237*	,269*
Sig. (bilateral)	.005	.000	.048	.024
N	70	70	70	70

	Variables licor de mezcla				
	IVF	NTLM	PT LM	DQOLM	Temperatura
Coefficiente de correlación	,311**	.216	-.001	,315**	-,481**
Sig. (bilateral)	.009	.072	.991	.009	.000
N	70	70	70	68	70

De las tablas se desprende que con dos asteriscos ($P < 0.01$) se encuentran:

- pHLM**
- Conductividad**
- IVF**
- DQOLM**

Y con solo un asterisco ($P < 0.05$):

- SSLM*
- SSVLM*

4.3.2 Análisis de componentes principales. Licor de Mezcla.

La tabla 4-15 muestra que la media de adecuación muestral de KMO se aproxima al valor de 0,6.

En este caso nos quedamos en el rango de adecuación muestral de regular según vemos en la tabla 3-15.

Pese a ello, es aceptable para poder llevar a cabo este análisis exploratorio.

Como podemos observar en la tabla 4-15, el nivel de significación, tal y como ya hemos indicado en el punto 3.6.4.2, es muy inferior a 0,05 con lo que se acepta la hipótesis nula y con ello se puede aplicar el análisis factorial.

Tabla 4-15 KMO y prueba de Bartlett del licor de mezcla

Medida de adecuación muestral de Kaiser-Meyer-Olkin.		,599
Prueba de esfericidad de Bartlett	Chi-cuadrado aproximado	814,416
	gl	55
	Sig.	,000

En este caso podemos ver en la tabla 4-16 los porcentajes de varianza que cada una de las componentes principales es capaz de explicar, y que tenemos en cuenta, se sitúa en las columnas agrupadas bajo el título “Suma de las saturaciones al cuadrado de la rotación” ya que lo que vamos a tomar en cuenta es el valor dado por la matriz de las componentes rotadas. El porcentaje acumulado de la varianza explicada alcanza un valor de 69.92 % un valor aceptable que nos hace tener que tomar las tres primeras componentes principales. Esto nos generará un espacio tridimensional en el que las variables se distribuirán y que debemos descomponer en los correspondientes espacios bidimensionales para un mejor análisis y comprensión.

Tabla 4-16 Varianza total explicada. Licor de mezcla

Componente	Autovalores iniciales			Sumas de las saturaciones al cuadrado de la extracción			Suma de las saturaciones al cuadrado de la rotación		
	Total	% de la varianza	% acumulado	Total	% de la varianza	% acumulado	Total	% de la varianza	% acumulado
1	3,884	35,309	35,309	3,884	35,309	35,309	2,920	26,549	26,549
2	2,494	22,672	57,981	2,494	22,672	57,981	2,599	23,627	50,176
3	1,313	11,939	69,921	1,313	11,939	69,921	2,172	19,744	69,921
4	,931	8,459	78,380						
5	,745	6,774	85,154						
6	,570	5,184	90,338						
7	,448	4,069	94,407						
8	,286	2,603	97,010						
9	,219	1,987	98,997						
10	,110	1,001	99,999						
11	,000	,001	100,000						

Método de extracción: Análisis de Componentes principales.

El programa SPSS nos ha devuelto en una de sus salidas la tabla 4-16 en la que vemos cuales son los porcentajes de varianza explicada por cada una de las componentes principales.

Un 26,54% para la primera, 23,62% para la segunda y solo un 19,74% para la tercera.

En principio nos podríamos quedar con las dos primeras ya que ellas solas explican el 50% de la varianza, pero hemos explorado también los pesos obtenidos por las variables en la tercera componente principal, ya que, como vemos en la tabla 4-17 existen tres variables que cargan de una manera determinante sobre dicho eje.

Tabla 4-17 Matriz de componentes rotados licor de mezcla

Variable	Componente		
	1	2	3
SSVLM	,936	-,027	-,057
SSLM	,922	-,216	-,039
pHLM	-,557	,265	-,287
%SSVLM	-,151	,911	-,062
PT LM	,448	-,770	,214
NTLM	-,286	,712	,259
IVF	,168	,686	,235
DQOLM	-,153	,036	,748
CondLM μ S/cm	,483	-,148	,718
Tª	-,026	-,240	-,707
G06	,540	,037	,581

Método de extracción: Análisis de componentes principales.

Método de rotación: Normalización Varimax con Kaiser.

La rotación ha convergido en 5 iteraciones.

En la tabla 4-17 puede verse la variabilidad, o el peso, que aportan cada uno de las variables en las componentes principales.

Así pues, se deduce que este espacio generado por las componentes principales será un espacio tridimensional en las que las variables se distribuirán dependiendo su peso receptivo en cada eje.

El espacio tridimensional presenta mayor dificultad a la hora de poder estudiar de manera visual la interacción entre las variables. Ver figura 4-5.

Por ello hemos descompuesto este espacio en dos planos en los que representar los pares de componentes que presentan mayor significación.

De esta manera se simplifica el análisis y es muchísimo más ilustrativo a la hora de presentar los datos obtenidos.

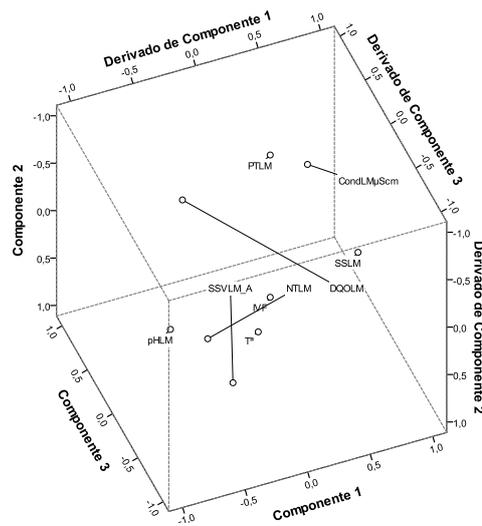


Figura 4-5 Gráfico de las tres componentes en espacio rotado. Licor de mezcla.

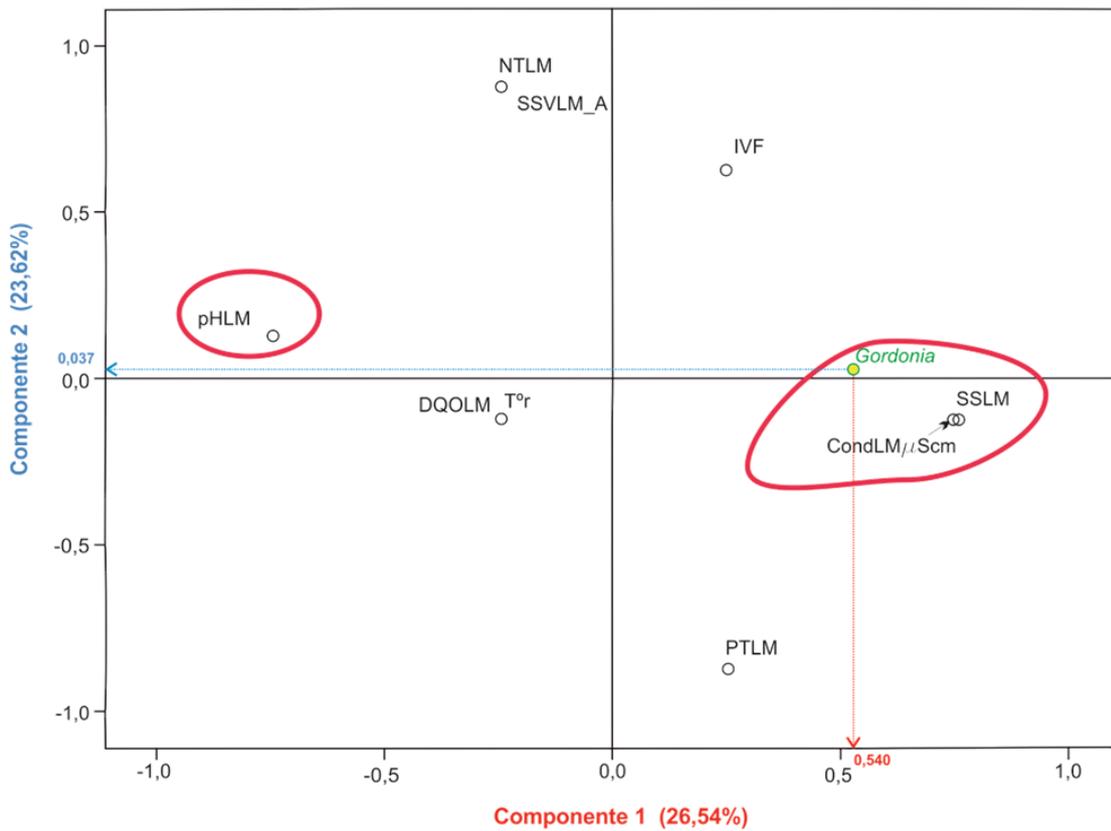


Figura 4-6 Gráfico de componentes en espacio rotado. Licor de mezcla. Componentes 1 y 2.

Como podemos apreciar en la figura 4-6, las variables que se han agrupado en el entorno de nuestra variable estudiada son;

- Respecto al eje de la primera componente: SSVLM, Conductividad y pH
- Respecto al eje de la segunda componente: NTLM, SSVLM y PTLM.

Pese a que en anteriores apartados no hemos incluido más que un gráfico bidimensional, hemos entendido que era conveniente incluir un segundo gráfico de dos de las componentes principales ya que si bien el peso que la variable “Gordonia” no es muy importante, se pone de manifiesto la relación inversa entre esta última variable y la variable “T^a” (temperatura).

Así pues, puede apreciarse como en la figura 4-7 se pone de manifiesto esta relación.

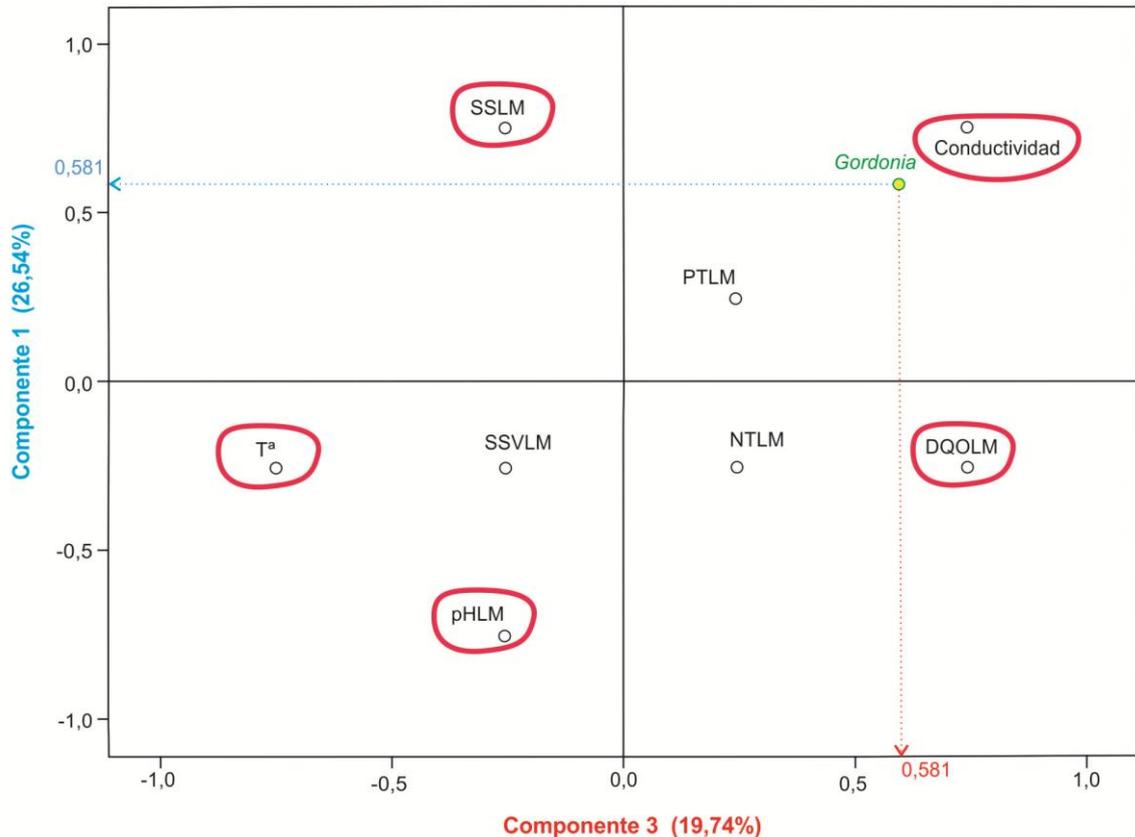


Figura 4-7 Gráfico de componentes en espacio rotado. Licor de mezcla. Componentes 1 y 3.

En este caso la figura 4-7 muestra las variables que se han agrupado en el entorno de nuestra variable estudiada son;

- Respecto al eje de la primera componente: SSLM, Conductividad y pH (como ya hemos comentado anterior mente)
- Respecto al eje de la tercera componente: DQOLM y la temperatura.

Seguidamente comentaremos el efecto de cada una de ellas individualmente sobre la población de *Gordonia*.

4.3.3 Temperatura (T)

La temperatura en el reactor biológico es uno de los factores ambientales más importantes implicados en la dinámica de fangos activos, ya que influye en la velocidad de las reacciones bioquímicas de los microorganismos (Zornoza et al. 2010).

En nuestro caso la temperatura presenta un coeficiente de correlación de Spearman de $r=0.481$ con una significación bilateral elevada ($P<0.01$, ver tabla 4-14), presenta respecto a el PCA unos pesos bajos tanto en la primera como en la segunda componente principal, sin embargo en la tercera componente principal presenta un peso de -0.707 bastante elevado (Ver tabla 4-17).

Las mycolata formadoras de espumas se dan con mayor frecuencia en climas cálidos (Eikelboom 1994), aunque "*M. parvicella*" es más frecuente en climas fríos (Seviour et al. 1994). Esto no excluye la posibilidad de que las mycolata puedan crecer en climas más fríos siempre. Algunos aislados, particularmente *Rhodococcus*, crecen a temperaturas tan bajas como 5°C , mientras que la temperatura mínima de crecimiento de *G. amarae* es de 15°C . De esto se deduce que el crecimiento de algunas bacterias formadoras de espumas puede producirse siempre y cuando no tengan limitaciones nutricionales. La temperatura óptima de crecimiento de estos microorganismos es de 25°C , mientras que las temperaturas máximas de crecimiento, al igual que las mínimas, son muy variadas. Algunos no pueden crecer a temperaturas mayores de 30°C o superiores y, sin embargo, otros lo hacen a más de 40°C . La capacidad para crecer a altas temperaturas puede ser muy significativa en algunas plantas de tratamiento, ya que la temperatura en las secciones donde aparece la espuma puede verse fuertemente incrementada por la incidencia directa del sol. (Cuesta Amat 2004; Cuesta Amat 2004)

Se ha descrito por diferentes autores (de los Reyes 2010)(Seviour & Nielsen 2010; de los Reyes 2010; Seviour & Nielsen 2010) que el crecimiento de las bacterias mycolata se puede producir en un rango de temperaturas entre los 23°C y los 37°C , e incluso a menor temperatura tal y como Lechevalier y Lechevalier (Lechevalier & Lechevalier 1974) recogieron en su descripción de la especie *Nocardia amarae*.

El género *Gordonia* presenta un rango de crecimiento que es más reducido. Los experimentos en planta piloto realizados por Pitt y Jenkins (1990) (Pitt & Jenkins 1990) solo se centraron en tres rangos de temperaturas; 18°C , 20°C y 25°C en los que se observó crecimiento.

Se ha observado que el óptimo de crecimiento de *Gordonia* se sitúa en 28°C (Lemmer & Poop 1982) además sugirieron que los fenómenos de foaming invernales eran debidos a *Rhodococcus spp.* y no a *Gordonia spp.*, sin embargo estos datos no se basan en métodos moleculares para la identificación de las poblaciones de mycolata.

En nuestro estudio, se ha observado como el desarrollo de las poblaciones de *Gordonia* presentan un límite de crecimiento presente en los 25°C , temperatura a la cual se aprecia un marcado descenso de la población, que dependiendo de otras condiciones, puede llegar a la práctica desaparición. También hemos observado una relación negativa entre el nivel de *Gordonia* observado y la temperatura. Según podemos apreciar en la tabla 4-17 como la variabilidad explicada en el análisis por PCA por parte de la temperatura es de $r=-0.707$ en la tercera componente principal. Esta relación inversa también se constata en los



resultados obtenidos mediante el cálculo de la constante de regresión de Spearman y que nos da un valor de la constante de regresión para la temperatura respecto a *Gordonia* de $r = -0.481$. Esta misma relación negativa se observa en estudios realizados por Asvapathanagul en el 2010 en los que se aprecia esa relación inversa y además una caída de la población de *Gordonia* al aumentar la temperatura y situarse en el entorno de los 25°C (Asvapathanagul et al. 2010)

Es bien conocido el efecto de la temperatura en el metabolismo microbiano al modificar un amplio número de parámetros como la cinética de reacción, la solubilidad de ciertas sustancias, etc. La temperatura no afecta de manera individual al crecimiento de estas poblaciones bacterianas, pero es un factor determinante para que los procesos que dan lugar a su proliferación o desaparición se desencadenen.

4.3.4 Temperatura y Aceites y Grasas (AG). Dos parámetros en un solo mecanismo.

Como ya hemos explicado con anterioridad, la temperatura por un lado y los aceites y grasas, representan dos factores que afectan directamente a la evolución de la población de *Gordonia* observada.

Pero dichos factores han sido identificados como parte del mismo mecanismo (Frigon et al. 2006).

La temperatura afecta de una manera directa en la velocidad de hidrólisis tal y como ya hemos explicado en el punto 4.3.3 de la discusión. Y es clara la relación encontrada entre este parámetro y la temperatura.

Por su parte, los aceites y grasas (AG) también presentan un importante efecto sobre la población de *Gordonia*. La formación y estabilización de las espumas por *Gordonia* se produce fundamentalmente por elevadas cargas de lípidos que dan una ventaja nutricional adicional a *Gordonia* (Frigon et al. 2006).

Pero cada uno de estos parámetros no actúa de manera independiente y son las dos caras de la misma moneda.

La temperatura determina la velocidad de hidrólisis y por lo tanto en el consumo de SDS el cual a su vez favorece el desarrollo de las bacterias del género *Gordonia* (Frigon et al. 2006).

Se han observado además episodios de foaming durante los periodos de otoño y primavera-verano (Kragelund et al. 2010). Estas observaciones contradicen lo observado con anterioridad, donde las temperaturas cálidas favorecían la aparición (Hug, Ziranke & Siegrist 2005) así como la carga de lípidos (Frigon et al. 2006).

Estudios realizados a nivel ribosómico (rRNA) han arrojado luz sobre la actividad metabólica que desarrolla *Gordonia* frente a otras bacterias respecto al tipo de sustrato, ya sea este lentamente biodegradable o por el contrario altamente biodegradable. El desarrollo de exoenzimas por parte de *Gordonia* presenta un consumo energético que no puede tomarse a la ligera ni modificarse de una forma rápida. La generación de dichos procesos al implicar gran gasto de energía provoca que *Gordonia* presente rRNA de forma más estable de lo que lo hacen las bacterias asimiladoras de sustratos fácilmente biodegradables, las

cuales no requieren de una producción importante de enzimas para metabolizar dichos sustratos (Frigon et al. 2002).

4.3.5 Sólidos en Suspensión y Volátiles Licor de Mezcla (SSLM, SSVLM)

No se aprecia una relación significativa entre los SSLM y el nivel de *Gordonia*.

Presenta un coeficiente de correlación de Spearman bajo ($r = 0.237$, $P < 0.05$) pese a tener un peso en la primera componente principal elevado (0.922).

De igual modo ocurre con los SSVLM (Ver tabla 4-14 y tabla 4-17).

4.3.6 Demanda Química de Oxígeno de Licor de Mezcla (DQOLM)

La DQOLM presenta un coeficiente lineal de Spearman de $r=0.315$ con un alto nivel de significación bilateral ($P<0.01$).

Por su parte solo es significativo el peso en la tercera componente principal del PCA en la que tiene un peso de 0.748.

4.3.7 Conductividad

La conductividad en la EDAR Castellón se mantuvo relativamente constante en las dos líneas analizadas (ver tabla 4-12 y tabla 4-13) variando en casi 3000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ en ocasiones. Por su parte la EDAR Quart-Benager mantuvo unos niveles más moderados en los que la máxima diferencia en la conductividad fue de 1400 $\mu\text{S}/\text{dm}$.

Se ha obtenido un coeficiente de regresión de Spearman de $r=0.575$ con elevado nivel de significación bilateral ($P<0.01$), y respecto al PCA realizado la conductividad en las dos componentes principales en las que aparece con mayor relevancia la variable *Gordonia* alcanza un valores de 0.483 y 0.718 para la componente principal 1 y 3 respectivamente.

Teniendo en cuenta que la primera componente principal explica el 26.54% de la variabilidad muestral y que la tercera explica un 19.74%, se puede considerar como significativa el efecto de la conductividad con la variable estudiada *Gordonia*.

4.4 Variables operacionales

Seguidamente se presentan los resultados de las Variables Operacionales como ya hemos hecho con los datos físico-químicos y de licor de mezcla.

En el apartado III de los Anexos se incluyen las gráficas comparativas de las variables que se han encontrado significativas y del nivel de *Gordonia*.

Tabla 4-18 Variables operacionales Quart-Benager

VARIABLES	Unidades	Media	Máximo	Mínimo	Desv.
CMdbo	Kg DBO5/kg SSVLM.d	0.20	0.47	0.08	0.09
TRHr	h	17.04	21.99	13.48	1.99
EF	días	10.79	28.97	5.24	5.67
O_bajo	% de día	33.21	69.44	4.63	17.99
O_medio	% de día	61.58	95.14	11.81	19.35
O_alto	% de día	5.21	40.39	0.00	9.82

Tabla 4-19 Variables operacionales Castellón 1

VARIABLES	Unidades	Media	Máximo	Mínimo	Desv.
CMdbo3	Kg DBO5/kg SSVLM.d	0.28	0.57	0.14	0.10
TRH3	h	5.49	6.27	4.71	0.51
EF7	días	5.63	8.69	2.87	1.54
O_bajo	% de día	14.98	34.44	0.00	9.91
O_medio	% de día	41.08	63.19	14.35	13.23
O_alto	% de día	43.93	85.65	10.37	21.42

Tabla 4-20 Variables operacionales Castellón 2

VARIABLES	Unidades	Media	Máximo	Mínimo	Desv.
CMdbo3	Kg DBO5/kg SSVLM.d	0.27	0.53	0.15	0.10
TRH3	h	5.40	6.23	4.87	0.38
EF7	días	7.30	13.36	3.12	2.74
O_bajo	% de día	22.28	50.36	0.00	13.51
O_medio	% de día	38.38	49.19	20.95	8.53
O_alto	% de día	39.36	73.50	13.29	17.91

4.4.1 Coeficiente de Spearman. Variables operacionales.

Finalmente, las variables operacionales presentan de igual modo variables con dos asteriscos ($P < 0.01$) ya que no existen con uno. Ver tabla 4-21.

Tabla 4-21 Coeficientes de Spearman para variables operacionales

	Variables operacionales					
	TRHr	EF	O_bajo	Cmdbo	O_medio	O_alto
Coeficiente de correlación	-,374**	-.194	-.083	.191	-.184	.186
Sig. (bilateral)	.001	.108	.495	.112	.128	.124
N	70	70	70	70	70	70

Estos valores son:

- TRHr**

4.4.2 Análisis de componentes principales. Variables operacionales

Tabla 4-22 KMO y prueba de Bartlett

Medida de adecuación muestral de Kaiser-Meyer-Olkin.	,689	
Prueba de esfericidad de Bartlett	Chi-cuadrado aproximado	260,719
	gl	28
	Sig.	,000

De igual manera que en apartados anteriores, vemos que la media de adecuación muestral KMO, presenta un valor que roza el 0,7 con lo que se adecua para la realización del análisis exploratorio.

También la prueba de esfericidad de Bartlett arroja un nivel de significancia inferior al 0,05 haciendo posible de igual manera el análisis.

En la matriz de componentes rotados (Tabla 4-23) se recogen los porcentajes de varianza explicados por las dos primeras componentes principales en el espacio rotado y se constata que el valor alcanzado conjuntamente es de un 61,81%. Con lo que se logra, con solo dos componentes, explicar gran parte de la varianza.

Tabla 4-23 Varianza total explicada. Variables operacionales

Componente	Autovalores iniciales			Sumas de las saturaciones al cuadrado de la extracción			Suma de las saturaciones al cuadrado de la rotación		
	Total	% de la varianza	% acumulado	Total	% de la varianza	% acumulado	Total	% de la varianza	% acumulado
1	3,674	45,927	45,927	3,674	45,927	45,927	3,473	43,418	43,418
2	1,272	15,896	61,823	1,272	15,896	61,823	1,472	18,404	61,823
3	,980	12,252	74,075						
4	,807	10,084	84,159						
5	,472	5,901	90,060						
6	,413	5,168	95,228						
7	,294	3,669	98,897						
8	,088	1,103	100,000						

Método de extracción: Análisis de Componentes principales.

Pese a ello, nuestra variable de estudio “Gordonia” carga de manera evidente sobre el eje de la primera componente principal y la segunda componente no explica prácticamente nada de la variabilidad de dicha variable.

Tabla 4-24 Matriz de componentes rotados

Variables	Componente	
	1	2
O_alto	-,908	,202
TRHr	,813	-,260
G06	-,749	,075
O_medio	,685	,061
EF	,646	-,355
O_bajo	,606	,191
Cmdbo	-,380	,734

Método de extracción: Análisis de componentes principales.

Método de rotación: Normalización Varimax con Kaiser.

a. La rotación ha convergido en 3 iteraciones.

En la figura 4-8 se muestra la distribución de las variables en el espacio generado por las dos componentes principales es:

- Respecto al eje de la primera componente: O_alto, O_bajo, O_medio, EF y TRHr
- No consideramos las variables del segundo eje ya que tienen muy poco peso la variables que estamos estudiando frente a el segundo eje (solo un 0.075)

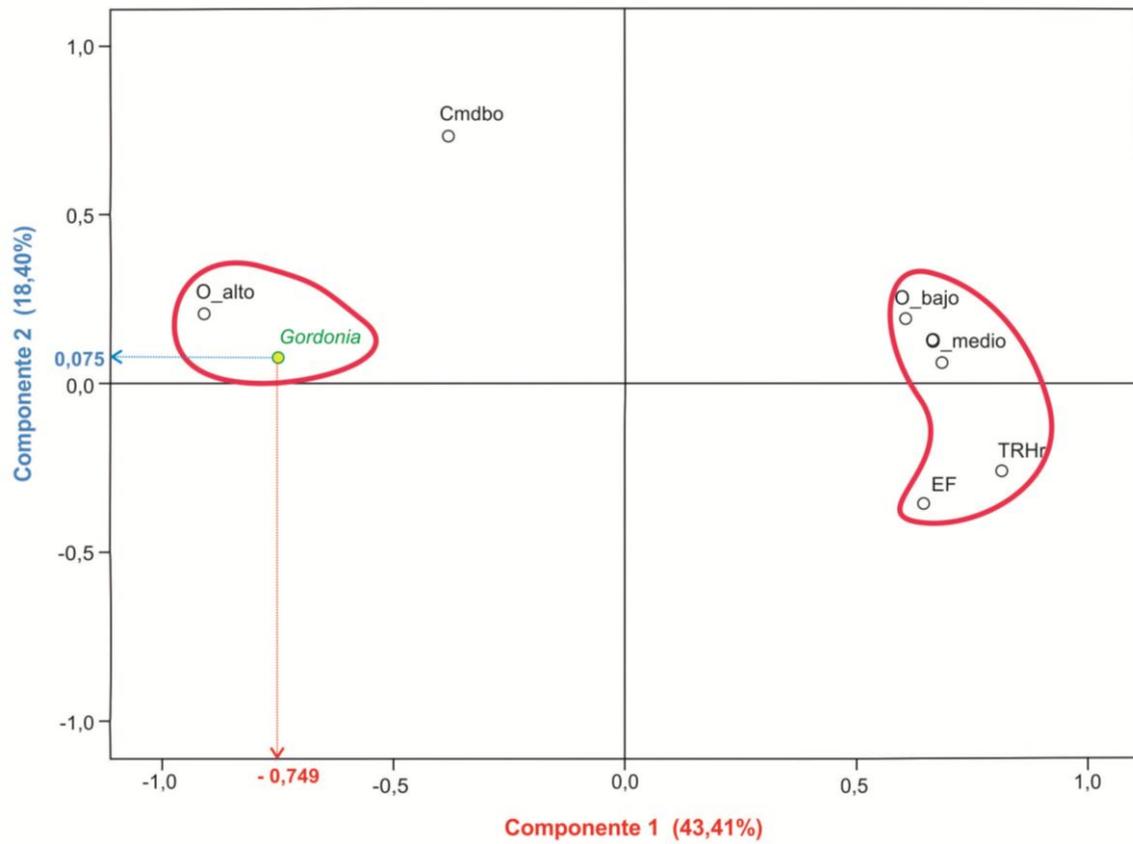


Figura 4-8 Gráfico de componentes en espacio rotado. Variables operacionales.

4.4.3 Edad del fango

La relación encontrada con la edad del fango ha sido desigual en los análisis estadísticos realizados. El coeficiente de correlación de Spearman presenta unos niveles bajos respecto a la relación de *Gordonia* con la edad del fango llegando a un valor de -0.194 con un nivel de significación bilateral por debajo de los exigidos para ser aceptado.

Esto contrasta con el peso obtenido en el análisis por PCA. En dicho análisis se alcanza un peso de 0.646, nivel suficientemente elevado para tenerlo en cuenta ya que en la primera componente principal *Gordonia* presentó un peso muy alto, siendo este de -0.749. De esto se deduce que el incremento de la variabilidad en la edad de fango produce un descenso en la variabilidad de *Gordonia*.

Ya que las bacterias del género *Gordonia* son actinomicetos de crecimiento lento, una reducción en la edad del fango supone la eliminación de los microorganismos del sistema. Sin embargo, ésta no resulta una medida totalmente efectiva por la variabilidad en la velocidad de crecimiento de los mycolata. Aunque esta medida controla el problema en situaciones adversas, la calidad del efluente se ve afectada. Los microorganismos filamentosos presentan menores valores de μ_{\max} y K_s que los microorganismos formadores de flocos (Seviour & Blackall 1988).

4.4.4 Tiempo de retención hidráulico (TRH)

El tiempo de retención hidráulica presenta un coeficiente de correlación significativo con los niveles de *Gordonia* observados de $r = -0.374$ y alta significación. En los análisis realizados con la técnica PCA se aprecia que la variabilidad producida en la primera componente por el TRH es alta, su peso de 0.813 indica que el aumento en la variabilidad de este parámetro produce variabilidad en la población de *Gordonia*.

Se ha encontrado una fuerte relación entre el TRH y *G. amarae*, la cual ha constatado que durante periodos en los que se da una temperatura óptima y una relación alta entre la DBO de origen carbonosa y la DBO del nitrógeno cuanto mayor sea el tiempo de contacto de *G. amarae* con estos nutrientes, se produce un incremento de la población de *G. amarae* (Asvaparhanagul et al. 2010).

Se ha demostrado que el aumento del TRH en EDAR ha producido una disminución en la población de bacterias formadoras de espumas (principalmente del género *Gordonia*). Se cree que esto se produce principalmente por el aumento del TRC favorece el desplazamiento del ecosistema hacia entornos en los que *Gordonia* tiene mayor dificultad para desarrollarse por la disminución de la carga que se produce al aumentar el TRH.

4.4.5 Oxígeno disuelto (OD)

En lo referente a la oxigenación se ha observado respecto al coeficiente de Spearman un valor muy poco significativo, $r = 0.186$, sin embargo en el análisis mediante PCA se ha observado que se produce una elevada relación entre los valores de oxígeno alto y *Gordonia*. Para la primera componente principal se ha observado que nuestra variable de estudio (*Gordonia*) presenta un alto peso con signo negativo (-0.749) el mayor de los pesos obtenido en el presente estudio de nuestra variable estudiada con respecto a las variables de la

componente principal en la que se agrupaba y para este eje se observa una fuerte relación con los niveles de oxígeno alto siendo el peso de este último de -0.908, también con valor negativo.

Con lo que se entiende que existe una relación directa entre los valores de oxígeno alto y los valores de *Gordonia* observados.

Aunque existe esta fuerte relación, cabe destacar que respecto a oxígeno medio y bajo se han alcanzado unos pesos de estas variables de 0.685 y 0.606 respectivamente. Con lo que se podríamos deducir que los niveles más altos de oxígeno favorecen el desarrollo de *Gordonia*.

Diferentes autores que relacionan el desarrollo de *Gordonia* en condiciones muy diversas. Esto se debe a que *Gordonia* presenta una gran versatilidad metabólica pudiendo desarrollarse en condiciones aerobias, anóxicas y anaerobias (Kragelund et al. 2007; Uotila et al. 1992).

4.4.6 Carga másica (CM)

Las bacterias filamentosas crecen peor que las no filamentosas con altas cargas másicas (F/M). Se ha determinado que se desarrollan dentro de un rango de 0.2-0.6 gDBO/gSSLM·d⁻¹.(Tsang, Sin & Chua 2008)

Algunos estudios han determinado que algunas especies de *Gordonia* como *Gordonia amarae* crece mejor que otras bacterias como *P. aeruginosa* a valores de carga másica (F/M) inferiores a 0.56 gDBO/gSSLM/d. Se ha demostrado que las bacterias del género *Gordonia*, como *G. amarae*, crecen más rápido que otras a bajas concentraciones de ácidos grasos. (Tsang, Sin & Chua 2008).

Esto, unido a su facilidad para hidrolizar los ácidos grasos explicaría el porqué estas bacterias se desarrollan con bajas cargas másicas ya que su mecanismo de hidrólisis las hacen especialmente competitivas en situaciones de baja carga y existencia de ácidos grasos de cadena larga en las que otras bacterias se ven en clara desventaja ya que muchas especies bacterianas como *Pseudomonas*, *Zooglea*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, y *Flavobacterium*, o no pueden o a duras penas hidrolizan para su crecimiento y proliferación cadenas largas de ácidos grasos para su crecimiento y proliferación.(Tsang, Sin & Chua 2008). La presencia de exoenzimas como esterasas, lipasas, glucuronidasas y fosfatasas favorecen su supervivencia en situaciones de estrés celular por su capacidad de consumir el material extracelular y almacenar biopolímeros de reserva (Kragelund et al. 2008)

5 Conclusiones

Las bacterias filamentosas del grupo mycolata que se identificaron por técnicas convencionales correspondían en su inmensa mayoría al género *Gordonia*, ya que las identificaciones realizadas con la técnica FISH han confirmado la presencia de este género con la sonda específica.

Entre las variables que presentan un coeficiente de correlación mayor destacan las sustancias que tienen presentes los nutrientes como el nitrógeno (CNTs, N_NH4_af, N_orgs_af y las Proteínas que son fuente de nitrógeno). La relación entre los compuestos del nitrógeno en el afluente y la variable *Gordonia* se producía en nuestro caso de forma positiva.

La relación entre los compuestos del fósforo en el afluente y la variable *Gordonia* se establece de forma positiva y el fósforo en forma de fosfatos (P PO4) es la variable con una relación más elevada.

Se ha encontrado una fuerte relación entre la población de *Gordonia* y los Aceites y Grasas (AG) del afluente, dicha relación es positiva. Cuando los niveles de aceites y grasas se situaban por debajo del umbral de los 10 mg/L afectaban al desarrollo de *Gordonia* negativamente, aunque no se ha podido contrastar este umbral con otros autores porque no existen datos publicados sobre este umbral en la bibliografía consultada. Pese a todo, parece ser que la cantidad de aceites y grasas no determina la población de *Gordonia* de manera aislada tal y como se describe en otros estudios, sino que actúa de manera conjunta con otros factores y principalmente con la temperatura.

En nuestro caso la temperatura presenta un coeficiente de correlación de Spearman con una significación bilateral elevada, con un peso alto en la tercera componente principal. En nuestro estudio, se ha observado como el desarrollo de las poblaciones de *Gordonia* presentan un límite de crecimiento a los 25 °C, a esta temperatura se aprecia un marcado descenso de la población, que dependiendo de otras condiciones, puede llegar a la práctica desaparición.

Existe una relación significativa y positiva entre el nivel de carbohidratos y la población de *Gordonia*, que estaría relacionada con la actividad extracelular enzimática que poseen las células de *Gordonia*.

Los parámetros del licor de mezcla como pH, conductividad, índice volumétrico de fango (IVF) y DQO presentan una relación significativa con los niveles de *Gordonia*, siendo la relación positiva en el caso de DQO, conductividad e IVF, y de manera negativa pH y temperatura.

El tiempo de retención hidráulico (TRH) presenta una elevada relación con el nivel de *Gordonia*, siendo este uno de los parámetros operacionales empleados para el control de las poblaciones de bacterias filamentosas.

Creemos que los parámetros que se han encontrado significativos en este trabajo, presentan un efecto conjunto sobre la población de *Gordonia* a tener en consideración en EDAR con problemas de espumas producidos por *Gordonia*.



6 Trabajos citados

Alonso, JL, Díaz, A, Cuesta, G, Bernácer, I & Morenilla, JJ 2009, 'Screening of *Gordonia* spp. in activated sludge plants of Spain using fluorescence in situ hybridation (FISH) and LNA/DNA probes.', in *ASPD5 IWA International Specialized Conference on Microbial Population Dynamics in Biological Wastewater Treatment*, Aalborg (Dinamarca).

APHA/AWA 2005, *Standar methods for the examination of water and wastewater*, 21st edn, American Public Health Association, Washington, DC.

Arensköter, M, Bröker, D & Steinbüchel, A 2004, 'Biology of the metabolically diverse genus *Gordonia*', *Applied Environmental Microbiology*, no. 70, pp. 3195-3204.

Asvaparhanagul, P, Bang, H, Lee, H & Olson, BH 2010, 'Current Rapid Identification of Bulking and Foaming Bacteria', Water Environment Federation. WEFTEC., USA.

Bendt, T, Rahman, A, Rolfs, C-H & Kelle-Emben, A 1989, 'Nocardioformen Actinomyceten in Modelkläranlagen', *Korrespondenz Abwasser*, no. 36, pp. 152-156.

Blackall, LL 1986, 'Actinomycete foaming in activated sludge wastewater', *Australian Microbiologist*, no. 7, pp. 365-373.

Blackall, LL, Harbers, AE, Greenfield, PF & Hayward, AC 1991, 'Activated sludge foams: effects of environmental variables on organisms growth and foam formation', *Environmental Technology*, no. 12, pp. 241-248.

Carr, E, Eales, KL & Seviour, R 2006, 'Substrate uptake by *Gordonia amarae* in activated sludge foams by FISH-MAR', *Water science and technology*, vol 54, no. 1, pp. 39-45.

Cattell, RB 1966, 'The Scree test for the number of factors', *Multivariate Behavioral Research*, no. 1, pp. 245-276.

Cattell, RB & Vogelman, SA 1977, 'A comprehensive trial of the Scree and KG criteria for determining the number of factors', *Multivariate Behavioral Research*, no. 12, pp. 289-325.

Chung, J, Blackall, LL, Kang, S-O, Yung, CH & Goodfellow, M 1997, 'A Proposal To Reclassify *Nocardia pinensis* Blackall et al. as *Skermania piniformis* gen. nov., comb. nov.', *IJSEM*, vol 47, no. 1, pp. 127-131.

Clescerl, LS, Greenberg, AE & Eaton, AD 1999, *Standard Methods for Examination of Water & Wastewater*, American Public Health Association.

Cuesta Amat, G 2004, 'Factores que inciden en el crecimiento de los actinomicetos formadores de espuma', in *Detección y caracterización por métodos fenotípicos y moleculares de mycolata formadores de espumas en estaciones depuradoras de aguas residuales domésticas con sistemas de fangos activos*, Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Biotecnología., Valencia.

Davenport, RJ & Curtis, TP 2002, 'Are filamentous mycolata important in foaming?', *Water Sciencie and Technology*, vol 46, no. 1-2, pp. 529-533.

de los Reyes, FL 2010, 'Foaming', in *Microbial Ecology of Activated Sludge*, IWA Publishing, London.

de los Reyes III, FL & Raskin, L 2002, 'Role of filamentous microorganisms in activated sludge foaming: relationship of mycolata levels to foaming initiation and stability', *Water Research*, vol 36, no. 2, pp. 445-459.

de los Reyes, F, Ritter, W & Raskin, L 1997, 'Group-specific small-subunit rRNA hybridization probes to characterize filamentous foaming in activated sludge systems.', *Applied and Environmental Microbiology*.

Eikelboom, DH 1994, 'The *Microthrix parvicella* puzzle', *Water Science and Technology*, no. 29, pp. 271-279.

Eikelboom, DH 2000, *Process Control of Activated Sludge Plants by Microscopic Investigation*, IWA Publishing, UK.

Eikelboom, DH 2002, *Process Control of Activated Sludge Plants by Microscopic Investigation*, IWA Publishing, UK.

Esteban, G, Tellez, C & Bautista, LM 1991, 'Dynamics of ciliated protozoa communities in activated sludge process', *Water Research*, no. 25, pp. 967-972.

Forster, CF 1992, 'Oils, fats and greases in wastewater treatment', *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, no. 55, pp. 402-404.

Franz, A & Matsché, N 1994, 'Investigation of a bacteria-enzyme additive to prevent foaming in activated sludge plants', *Water Science and Technology*, vol 29, no. 7, pp. 281-284.

Frigon, D, Armaiz, E, Oerther, DB & Raskin, L 2002, 'Who eats what? Classifying microbial population based on diurnal profiles of rRNA levels', *Water Science & Technology*, vol 46, no. 1-2, pp. 1-9.

Frigon, D, Guthrie, RM, Bachman, GT, Royer, J, Bailey, B & Raskin, L 2006, 'Long-term analysis of a full-scale activated sludge wastewater treatment system exhibiting seasonal biological foaming.', *Water Research*, no. 40, pp. 990-1008.

Gujer, W, Henze, M, Mino, T & van Loosdrecht, MCM 1999, 'Activated sludge model no. 3', *Water Science and Technology*, vol 39, no. 1, pp. 183-193.

Hotelling, H 1933, 'Analysis of a complex of statistical variables into principal components.', *Journal of Educational Psychology*, no. 24, pp. 417-441 y 498-520.

Hotelling, H 1936, 'Relations between two sets of variates', *Biometrika*, no. 27, pp. 321-377.

Hug, T 2006, *Characterization and controlling of foam and scum in activated sludge systems*, ETH Ph.D. Dissertation.

Hug, T, Ziranke, M & Siegrist, GT 2005, 'Dynamics of population and scumming on a full-scale wastewater treatment plant in Switzerland', *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, no. 33, pp. 216-222.

Jenkins, D, Richard, M & Daigger, G 2003, *Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking, Foaming and other Solids Separation Problems.*, IWA Publishing.

Kaiser, HF 1958, 'The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis', *Psychometrika*, vol 3, no. 23.



Kampfer, P 1997, 'Detection and cultivation of filamentous bacteria from activated sludge', *FEMS Microbiology Ecology*, vol 3, no. 23, pp. 169-181.

Khan, AN & Forster, CF 1991, 'Aspects of the nutrition and growth of *Rhodococcus rubra* in relation to the foam formation', *Environmental Technology*, no. 12, pp. 271-277.

Klatte, FAR&RMK 1994, 'Transfer of *Rhodococcus aichiensis* Tsukamura 1982 and *Nocardia amarae* Lechevalier and Lechevalier 1974 to the genus *Gordona* as *Gordona aichiensis* comb. nov. and *Gordona amarae* comb. nov.', *International Journal of Systematic Bacteriology*, pp. 769-773.

Klein, AN 2003, *Use of molecular techniques to assess the role of novel organisms in biological foaming at wastewater treatment plants*, M.S. Thesis, Department of Civil and Environmental Engineering. University of Illinois, Urbana, IL. USA.

Kragelund, C, Müller, A, Nielsen, JL, Daims, H & Nielsen, PH 2008, 'Viability and survival of filamentous mycolata in foam', *The 12th International Symposium on Microbial Ecology. ISME 12*, Cairns, Australia.

Kragelund, C, Nilsson, B, Eskilsson, K, Bogh, AM & Nielsen, PH 2010, 'Full-scale control of Mycolata foam by FEX-120 addition', *Water Science & Technology*, vol 61, no. 10, pp. 2443-2450.

Kragelund, C, Remesova, Z, Nielsen, JL, Thomsen, TR, Eales, K, Seviour, R, Wanner, J & Nielsen, PH 2007, 'Ecophysiology of mycolic acid-containing Actinobacteria (Mycolata) in activated sludge foams', *Microbiol Ecology (Federation of European Microbiological Societies)*, no. 67, pp. 174-184.

Kubota, K, Ohashi, A, Imachi, H & Harada, H 2006, 'Improved In Situ Hybridization Efficiency with Locked-Nucleic-Acid-Incorporated DNA Probes', *Applied and Environmental Microbiology*, vol 8, no. 72, pp. 5311-5317.

Kurane, R, Toeda, K, Takeda, K & Suzuki, T 1986, 'Culture conditions for production of microbial flocculants', *Agricultural and biological chemistry*, vol 9, no. 50, pp. 2309-2313.

Lechevalier, MP & Lechevalier, HA 1974, '*Nocardia amarae* sp. nov., an actinomycete common in foaming activated sludge', *International Journal of Systematic Bacteriology*, no. 24, pp. 278-288.

Lemmer, H 1986, 'The ecology of scum causing actinomycetes in sawage treatment plants', *Water Research*, vol 4, no. 20, pp. 531-535.

Lemmer, H & Poop, W 1982, 'Mikrobiologische Ursachen von Schwimmschlamm in Belebungsanlagen (Microbiological causes of floating sludge in aeration tanks)', *Korrespondenz Abwasser*, no. 29, pp. 808-811.

Liu, C, Wang, H, Xing, W & Wei, L 2013, 'Composition diversity and nutrition conditions for accumulation of polyhydroxyalkanoate (PHA) in bacterial community from activated sludge', *Appl. Microbiolgy Biotechnology*, no. 97, pp. 9377-9387.

Lopez-Vazquez, CM, Hooijmans, CM, Brdjanovic, D, Gijzen, HJ & Van Loosdrecht, MCM 2008, 'Factors affecting the microbial populations at full-scale enhanced biological phosphorus removal (EBPR) wastewater treatment plants in The Netherlands', *Water Research*, vol 42, no. 10-11, pp. 2349-2360.

Macnaughton, SJ 1994, 'Tuberculostearic acid as a means of estimating the recovery (using dispersion and differential centrifugation) of actinomycetes from soil', *Journal of Microbiological Methods*, vol 20, no. 1, pp. 69-77.

Madoni, P, Davoli, D & Gibin, G 2000, 'Survey of filamentous microorganisms from bulking and foaming activated-sludge', *Water Research*, vol 6, no. 34, pp. 1767-1772.

Martins, AM, Pagilla, K, Heijnen, JJ & Van Loosdrecht, MC 2004, 'Filamentous bulking sludge - a critical review', *Water Research*, no. 38, pp. 793-817.

McNeil, MM & Brown, JM 1994, 'The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology', *Clin. Microbiol. Rev.*, no. 7, pp. 357-417.

Metcalf & Eddy, INC. 2000, *Ingeniería de Aguas Residuales. Tratamiento, vertido y reutilización.*, Tercera edición. edn, McGraw-Hill.

Mielczarek, AT, Kragelund, C, Eriksen, PS & Nielsen, PH 2012, 'Population dynamics of filamentous bacteria in Danish wastewater treatment plants with nutrient removal', *Water Research*, no. 46, pp. 3781-3795.

Mielczarek, AT, Kragelund, C, Eriksen, PS & Nielsen, PH 2012, 'Population dynamics of filamentous bacteria in Danish wastewater treatment plants with nutrient removal', *Water Research*, no. 46, pp. 3781-3795.

Nielsen, PH, Mielczarek, AT, Kragelund, C, Nielsen, JN, Saunders, AM, Kong, Y, Hansen, AA & Vollertsen, J 2010, 'A conceptual ecosystem model of microbial communities in enhanced biological phosphorus removal plants', *Water Research*, no. 44, pp. 5070-5088.

Oerther, DB, De Los Reyes III, FL, De Los Reyes, MF & Raskin, L 2001, 'Quantifying filamentous microorganisms in activated sludge before, during, and after an incident of foaming by oligonucleotide probe hybridizations and antibody staining', *Water Research*, vol 35, no. 14, pp. 3325-3336.

Pearson, K 1901, 'On Lines and Planes of Closest Fit to Systems of Points in Space', *Philosophical Magazine* 2, no. 11, pp. 559-572.

Pham, SA, Dé, I, Rolston, KV & Tarrand, JJ 2003, 'Catheter related bacteremia caused by the nocardioform actinomycete *Gordonia terrae*', *Clinical Infectious Diseases*, no. 36, pp. 524-527.

Pipes, W 1978, 'Actinomycete scum production in activated sludge processes', *Water Pollution Control Federation*, no. 50, pp. 628-634.

Pitt, P & Jenkins, D 1990, 'Causes and control of *Nocardia* in activated sludge', *Journal of Water Pollution Control Federation*, no. 62, pp. 143-150.

Pujol, R, Duchene, P, Schetrite, S & Canler, JP 1991, 'Biological foams in activated sludge plants: characterization of the situation', *Water Research*, no. 25, pp. 1399-1404.

Reyes, FLDL 2010, *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*.

Schuler, B, Lipman, EA, Steinbach, PJ, Kumke, M & Eaton, WA 2005, 'Polyproline and the "spectroscopic ruler" revisited with single-molecule fluorescence', *PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America)*, vol 102, no. 8, pp. 2754-2759.



Schuppler, MM, Wagner, G, Schön, G & Göbel, UB 1998, 'In situ identification of nocardioform actinomycetes in activated sludge using fluorescent rRNA-targeted oligonucleotide probes', *Microbiology*, no. 144, pp. 249–259.

Seviour, RJ & Blackall, LL 1988, *The microbiology of activated sludge*, Chapman & Hall Ltd.

Seviour, RJ & Nielsen, PH 2010, *Microbial Ecology of Activated Sludge*, IWA Publishing.

Seviour, EM, Williams, C, DeGrey, B, Soddell, JA, Seviour, RJ & Lindrea, KC 1994, 'Studies on filamentous bacteria from Australian activated sludge plants', *Water Research*, no. 28, pp. 2335-2342.

Soddell, JA 1999, 'Foaming', in RJ,BLL() Seviour (ed.), *The Microbiology of Activated Sludge*, Seviour, R.J., Blackall, L.L. (Eds.), Boston, MA, EEUU.

Soddell, JA & Seviour, RJ 1990, 'Microbiology of foaming in activated sludge plants - A Review', *Journal of Applied Bacteriology*, vol 2, no. 69, pp. 145-176.

Soddell, J & Seviour, R 1996, 'Growth of an activated sludge foam-forming bacterium, *Nocardia pinensis*, on hydrophobic substrates', *Water Science and Technology*, vol 34, no. 5-6, pp. 113-118.

Soddell, JA & Seviour, RJ 1998, 'Numerical taxonomy of *Skermania piniformis* and related isolates from activated sludge', *Journal of Applied Microbiology*, no. 84, pp. 272-284.

Stryer, L & Haugland, RP 1967, 'Energy Transfer: A Spectroscopic Ruler*', *PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America)*, vol 58, no. 2, pp. 719-726.

Tsang, YF, Sin, SN & Chua, H 2008, 'Nocardia foaming control in activated sludge process treating domestic wastewater', *Bioresource Technology*, no. 99, pp. 3381-3388.

Tsukamura 1982,.

Uotila, JS, Kitunen, VH, Apajalahti, JHA & Salkinoja-Salonen, MS 1992, 'Environment-dependent mechanisms of dehalogenation by *Rhodococcus chlorophenolicus* PCP-1', *Microbiological Biotechnology*, no. 38, pp. 408-412.

van der Waarde, J, Krooneman, J, Geurkink, B, van der Werf, A, Eikelboom, D, Beimfohr, C, Snaidr, J, Levantesi, C & Tandoi, V 2002, 'Molecular monitoring of bulking sludge in industrial wastewater treatment plants', *Water Science & Technology*, vol 46, no. 1-2, pp. 551–558.

Wagner, M & Loy, A 2002, 'Bacteria community composition and function in sawage treatment system', *Current Opinion in Bacteriology*, no. 13, pp. 218-227.

Wanner, J 1994, *Activated Sludge: Bulking and Foaming Control*, CRC Press, Lewis Publishers, USA.

Wanner, J & Grau, P 1989, 'Identification of filamentous microorganisms from activated-sludge', *Water Research*, vol 7, no. 23, pp. 883-891.

Zornoza, AM 2012, 'Análisis de las correlaciones entre los parámetros operacionales, Físico-Químicos y biológicos asociados al proceso de fangos activos.', IIAMA, Valencia.

Zornoza, A, Alonso, JL, Serrano, S, Fajardo, V, Zorrilla, F, Bernácer, I & Morenilla, JJ 2010, 'Estudio integrado del proceso de fangos activos I. Análisis descriptivo de factores físico-químicos y biológicos implicados en su dinámica.', VII Jornadas de Transferencia de Tecnología sobre Microbiología del Fango Activo (2010), Sevilla. Spain. Asociación Científica Grupo Bioindicación de Sevilla., Sevilla.

I Anexo: Descripción de las instalaciones.

I.1 EDAR Quart-Benàger:

Se trata de una EDAR que da servicio a una población de 166.942 he y trata un caudal de 35.903 m³/día.

Da servicio a los municipios de Alaquàs, Aldaia, Manises, Mislata, Quart de Poblet, Xirivella y parte del área sur de la ciudad de Valencia.

Alcanza unos rendimientos de eliminación del 98% en SS, 98% respecto a la DBO₅ y de un 95% en la DQO.

Su esquema de diseño se presenta en la figura 6-3 y en la figura 6-1 se muestra la vista aérea de la EDAR.

Presenta un proceso de fangos activados mediante cuatro tanques de aireación de capacidad 6.750 m³ cada uno.

El proceso de tratamiento de fangos activos elimina también fósforo ya que se trata de un proceso Anóxico-Aerobio. (A-O con eliminación de nutrientes)



Figura 6-1 Vista aérea de la depuradora Quart-Benàger.

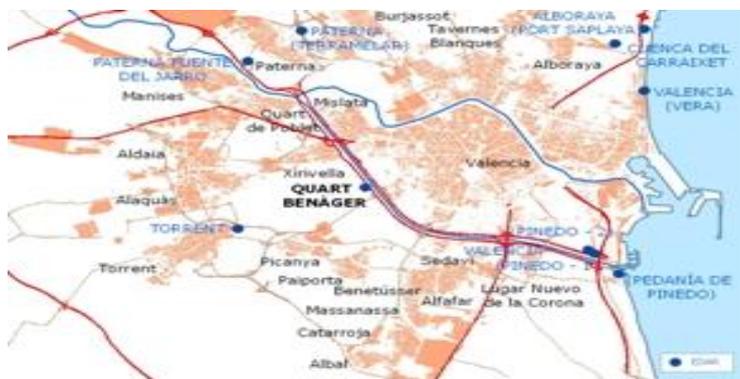


Figura 6-2 Emplazamiento de la EDAR Quart-Benàger.

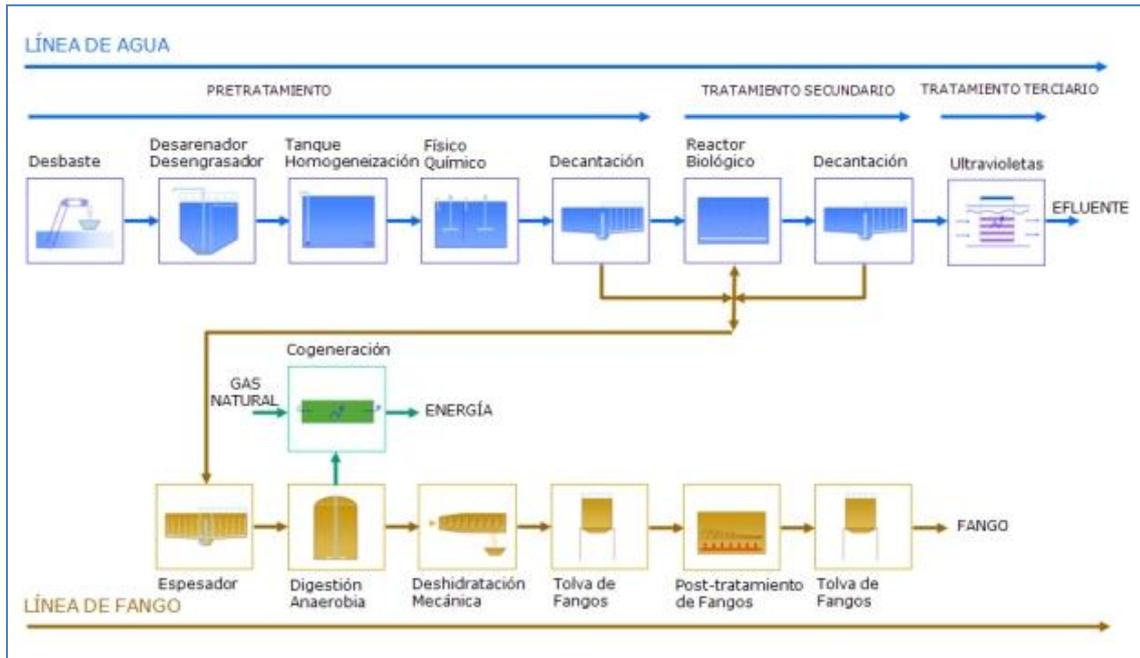


Figura 6-3 Esquema de tratamiento de la EDAR Quart-Benager.

I.II EDAR Castelló de la Plana

La EDAR de Castelló de la Plana da servicio a una población de 193.773 (he) únicamente del municipio que le da el nombre.

El caudal de tratamiento de la depuradora es de 43.220 m³/día

La capacidad de los tanques de tratamiento biológico es de 6.200 m³.

Sus rendimientos de eliminación de SS es del 95%, de la DBO₅ se sitúa en un 95% y finalmente un 91% de la DQO.

En este caso esta depuradora no realiza la eliminación de nutrientes. (A-O sin eliminación de nutrientes)

El hecho de considerar a Castellón como dos plantas depuradoras viene de la existencia de una ampliación que se realizó.

Por esta razón nosotros trabajamos a efectos del estudio como si se trataran de dos depuradoras independientes.

Además, la operatividad de planta es distinta como se puede comprobar en los datos operacionales de cada una de las líneas.



Figura 6-4 EDAR Castelló de la Plana.



Figura 6-5 Emplazamiento de la EDAR de Castelló de la Plana.

El esquema de tratamiento se recoge en la figura 6-6.

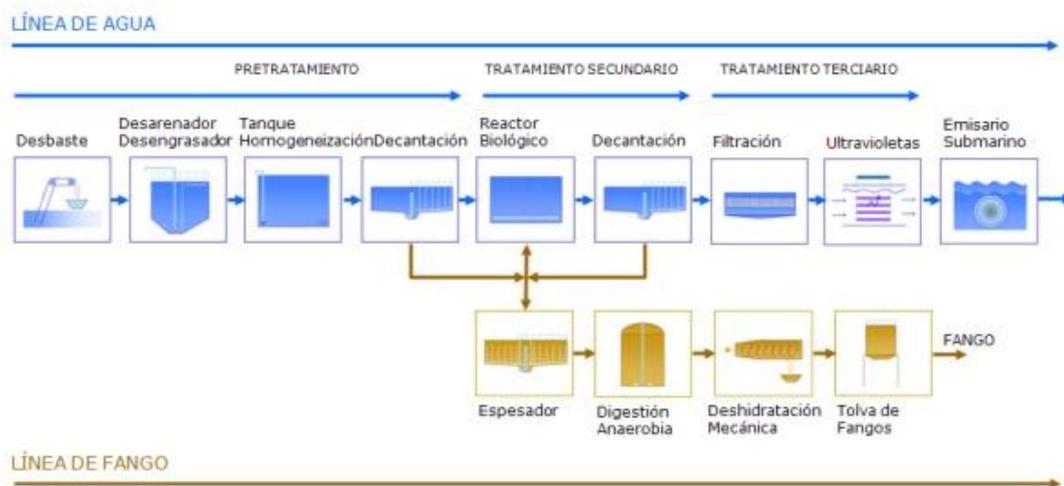


Figura 6-6 Esquema de tratamiento de la EDAR Castelló de la Plana.

II Anexo: Valores empleados en el estudio

II.I Parámetros Físico-Químicos

Tabla II-1 Parámetros Físico-Químicos de Quart-Benager

PARÁMETROS	MEDIA	MAX.	MIN.	DESV
Caudal 0	41750.88	62230.00	25939.00	10565.82
SSVLM	1947.12	2498.00	1455.00	304.89
Volumen reactor	23760.00	27000.00	20250.00	3441.84
TRHr	14.29	25.00	8.72	3.33
pH afl.	7.82	8.08	7.59	0.14
Conductividad afl.	2420.40	3060.00	1920.00	345.02
Sólidos Suspendidos Totales afl.	118.80	202.00	68.00	34.42
Sólidos Suspendidos Volátiles Totales afl.	98.36	166.00	54.00	28.60
% Sólidos Suspendidos Volátiles afl.	83.05	97.14	64.00	7.45
V60 afl.	1.31	4.00	0.20	0.83
DQO total	417.76	804.00	204.00	162.47
DQO filtrada	254.56	526.00	114.00	115.56
DQO soluble	221.44	496.00	90.00	109.03
pDQOs1	51.76	75.38	41.74	8.16
pDQOs3	48.84	61.00	37.00	4.99
pDQOs2a	51.00	70.00	43.00	5.82
pDQOs2b	47.00	63.00	28.00	6.17
DQO particulada suspendida	163.20	292.00	90.00	63.80
%DQO particulada suspendida	39.90	55.65	20.06	7.64
DQO particulada coloidal	33.12	86.00	4.00	18.82
% DQO particulada coloidal	8.34	19.55	1.24	4.54
mg DQO part/mg SST	1.36	1.71	0.88	0.23
mg DQO part/mg SSTV	1.65	2.32	1.02	0.36
DBO afl.	244.78	480.00	90.00	112.97
DBO filtrada	137.06	390.00	50.00	88.44
DBO particulada suspendida	85.29	170.00	40.00	36.08
mg DBO part/mg SST	0.79	1.43	0.54	0.22
mg DBO part/mg SSTV	0.98	1.85	0.59	0.32
DQO/DBO	1.75	2.33	1.43	0.20
DQO/DBO (filtrada)	1.86	3.09	1.35	0.42
Nitrógeno total afl.	53.60	83.50	31.50	17.00
Carga Nitrógeno total soluble	0.05	0.10	0.03	0.02
Carga Nitrógeno total soluble hidráulica	3.67	11.70	1.18	2.10
N total soluble afl.	45.37	72.00	24.00	15.66
Carga Nitrógeno total soluble	0.04	0.09	0.02	0.02
Carga Nitrógeno total soluble hidráulica	3.07	9.88	1.07	1.76
N-NH4	40.26	62.20	24.00	12.11
porcentaje N-NH4	75.77	88.27	66.13	6.24
Carga N-NH4	0.04	0.08	0.02	0.01
Carga N-NH4 hidráulica	2.75	8.87	0.96	1.54
N-org soluble	5.26	13.70	0.00	4.19
Carga N-org soluble	4.61	11.27	0.00	3.79
N-org particulado	8.22	15.00	0.50	3.07
Nitrógeno orgánico total	13.48	23.90	4.40	5.86
P total afl.	5.24	9.70	3.10	1.96
Carga fósforo total	4.79	8.99	1.81	2.04
Carga fósforo total hidráulica	0.36	0.95	0.07	0.18
P total soluble afl.	2.84	5.50	1.00	1.31
Carga fósforo total soluble	2.60	5.70	0.72	1.33
Carga fósforo total soluble hidráulica	0.19	0.54	0.04	0.11
P-PO4 afl.	2.52	4.80	1.00	1.22
%P_PO4_af	47.01	80.56	32.26	10.95



Carga P-PO4	2.31	5.37	0.72	1.27
Carga P-PO4 Hidráulica	0.17	0.48	0.03	0.11
P-org soluble	0.29	1.10	0.00	0.22
Carga de P-org soluble	0.24	0.75	0.00	0.16
P-org particulado	2.41	4.30	0.50	0.89
P-org total	2.70	4.90	0.70	0.99
DBO5/NKT	4.54	7.93	2.65	1.14
DQOsol/NKTs	4.86	10.12	2.88	1.52
DBO5/PT	48.76	97.87	27.27	13.97
DQOs/PTs	83.76	183.70	41.57	32.97
Sulfuros afl.	0.02	0.50	0.00	0.10
Carga sulfuros	0.00	0.00	0.00	0.00
Carga sulfuros hidráulico	0.00	0.00	0.00	0.00
Sulfatos afl.	221.04	293.00	159.00	34.63
Carga sulfatos	0.21	0.33	0.12	0.05
Carga sulfatos hidráulica	15.87	37.71	6.81	6.27
T. aniónicos afl.	3.27	7.50	1.23	1.82
Carga tensioactivos aniónicos	3.09	10.20	0.87	2.18
Carga tensioactivos aniónicos hidráulica	0.24	1.17	0.05	0.23

Tabla II-2 Parámetros Físico-Químicos Castellón línea 1

PARÁMETROS	MEDIA	MAX.	MIN.	DESV
Caudal 0	19680.17	22065.00	16813.00	1611.80
SSVLM	2919.78	4550.00	1840.00	783.41
Volumen reactor	4478.00	4478.00	4478.00	0.00
TRHr	5.41	6.30	4.47	0.53
pH afl.	7.88	8.14	7.51	0.16
Conductividad afl.	3479.78	4560.00	2450.00	459.11
Sólidos Suspendidos Totales afl.	126.04	205.00	59.00	32.03
Sólidos Suspendidos Volátiles Totales afl.	99.13	145.00	54.00	20.97
% Sólidos Suspendidos Volátiles afl.	80.52	97.89	47.62	12.58
DQO total	372.09	548.00	188.00	83.74
DQO filtrada	182.59	290.00	90.00	49.44
DQO soluble	169.22	269.00	81.00	56.29
pDQOs1	45.28	65.96	24.40	10.26
pDQOs3	44.13	55.25	35.51	5.66
pDQOs2a	44.77	58.17	35.13	6.41
pDQOs2b	43.56	57.24	31.26	6.28
DQO particulada suspendida	237.13	505.00	46.00	119.35
%DQO particulada suspendida	48.84	66.79	24.47	10.12
DQO particulada coloidal	30.29	58.00	3.00	14.93
% DQO particulada coloidal	8.70	15.00	0.71	4.22
mg DQO part/mg SST	1.92	3.84	0.43	0.92
mg DQO part/mg SSTV	2.43	5.23	0.57	1.22
DBO afl.	180.00	270.00	95.00	54.96
DBO filtrada	95.94	160.00	40.00	33.87
DBO particulada suspendida	72.88	140.00	7.00	32.73
mg DBO part/mg SST	0.61	1.10	0.07	0.30
mg DBO part/mg SSTV	0.74	1.39	0.09	0.34
DQO/DBO	2.14	3.13	1.63	0.38
DQO/DBO (filtrada)	2.01	3.20	1.46	0.46
Nitrógeno total afl.	58.48	80.00	36.00	10.55
Carga Nitrógeno total soluble	0.09	0.15	0.04	0.02
Carga Nitrógeno total soluble hidráulica	17.16	30.64	7.64	4.66
N total soluble afl.	51.09	78.00	35.00	9.70
Carga Nitrógeno total soluble	0.08	0.14	0.04	0.02
Carga Nitrógeno total soluble hidráulica	14.97	29.88	7.43	4.28
N_NH4_af	46.57	66.00	32.00	7.60
porcentaje N-NH4	80.07	91.30	72.86	5.13
Carga N-NH4	0.07	0.12	0.03	0.02
Carga N-NH4 hidráulica	13.67	25.28	6.79	3.64
N-org soluble	4.52	12.00	0.00	3.94
Carga N-org soluble	6.99	22.06	0.00	6.33
N-org particulado	7.39	16.00	1.00	4.22
Nitrógeno orgánico total	11.91	19.00	4.00	4.23
P total afl.	10.47	20.00	5.00	3.59
Carga fósforo total	16.39	36.77	5.94	6.22
Carga fósforo total hidráulica	3.09	7.66	1.19	1.35
P total soluble afl.	8.82	19.00	4.30	3.43
Carga fósforo total soluble	13.82	34.93	4.56	5.95
Carga fósforo total soluble hidráulica	2.60	7.28	0.91	1.27
P-PO4 afl.	7.78	16.35	3.92	3.01
Porcentaje P-PO4 afl	74.47	96.89	50.54	10.73
Carga P-PO4	12.11	30.06	4.16	4.98
Carga P-PO4 Hidráulica	2.28	6.26	0.83	1.07
P-org soluble	1.04	3.34	0.00	0.91
Carga P-org soluble	1.71	5.54	0.00	1.62
P-org particulado	1.65	6.50	0.20	1.27



P-org total	2.69	6.51	0.25	1.44
DBO5/NKT	3.07	4.67	1.64	0.77
DQOsol/NKTs	3.29	4.88	1.62	0.84
DBO5/PT	10.47	20.00	5.00	3.59
DQOs/PTs	20.33	37.74	9.64	6.65
Sulfuros afl.	1.79	9.00	0.40	2.16
Carga sulfuros	3.02	14.98	0.41	3.76
Carga sulfuros hidráulica	0.58	3.35	0.08	0.78
Sulfatos afl.	266.09	375.00	182.00	50.49
Carga sulfatos	0.42	0.58	0.23	0.09
Carga sulfatos hidráulica	77.26	109.62	41.72	17.31
Tens. aniónicos afl.	4.53	7.00	1.50	1.13
Carga tensioactivos aniónicos	7.12	9.98	1.59	1.81
Carga tensioactivos aniónicos hidráulica	1.33	2.05	0.32	0.38
Carbohidratos	7.05	12.00	5.00	1.79
Carga Carbohidratos	11.28	22.06	6.67	3.59
Carga Carbohidratos hidráulica	2.10	4.60	1.32	0.74
Proteínas	56.05	80.00	40.00	11.20
Carga Proteínas	89.98	147.09	46.93	24.02
Carga Proteínas hidráulica	16.81	30.64	7.45	5.18
Aceites y grasas	16.09	27.00	4.00	6.10
Carga Aceites y grasas	25.51	49.61	5.33	9.87
Carga Aceites y grasas hidráulica	4.74	8.41	1.16	1.89
Ácidos Grasos Volátiles	26.13	79.60	0.00	27.11
Carga Ácidos Grasos Volátiles	40.55	127.23	0.00	41.36
Carga Ácidos Grasos Volátiles hidráulica	7.26	20.62	0.00	7.42

Tabla II-3 Parámetros Físico-Químicos Castellón línea 2

PARÁMETROS	MEDIA	MAX.	MIN.	DESV
Caudal 0	22052.00	27253.00	13066.00	3223.96
SSVLM	2996.96	4920.00	1490.00	890.09
Volumen reactor	5125.00	5125.00	5125.00	0.00
TRHr	5.36	6.70	4.46	0.49
pH afl.	7.98	8.35	7.45	0.25
Conductividad afl.	3461.30	4520.00	2500.00	411.69
Sólidos Suspendidos Totales afl.	164.39	565.00	45.00	103.92
Sólidos Suspendidos Volátiles Totales afl.	126.46	389.00	42.00	73.77
% Sólidos Suspendidos Volátiles afl.	78.34	93.33	53.91	10.12
DQO total	394.61	775.00	214.00	122.71
DQO filtrada	148.18	288.00	81.00	51.75
DQO soluble	151.48	280.00	64.00	68.24
pDQOs1	38.43	62.16	14.97	12.64
pDQOs3	38.58	53.22	25.68	9.20
pDQOs2a	38.20	57.96	22.67	9.84
pDQOs2b	38.66	50.52	21.82	9.05
DQO particulada suspendida	243.13	659.00	131.00	107.23
%DQO particulada suspendida	61.57	85.03	37.84	12.64
DQO particulada coloidal	237.35	642.00	96.00	122.78
% DQO particulada coloidal	59.90	82.84	38.46	11.44
mg DQO part/mg SST	1.67	3.87	0.93	0.64
mg DQO part/mg SSTV	2.14	4.14	1.11	0.71
DBO afl.	196.30	380.00	80.00	76.81
DBO filtrada	78.12	190.00	24.00	46.03
DQO/DBO	2.15	3.28	1.23	0.56
DBO particulada suspendida	109.82	315.00	40.00	71.04
mg DBO part/mg SST	0.77	2.70	0.28	0.61
mg DBO part/mg SSTV	0.95	3.10	0.35	0.70
DQO/DBO	2.15	3.28	1.23	0.56
DQO/DBO (filtrada)	2.20	4.25	1.39	0.73
Nitrógeno total afl.	61.65	92.00	39.00	13.91
Carga Nitrógeno total	0.09	0.16	0.05	0.03
Carga Nitrógeno total hidráulico	17.87	36.23	9.15	7.09
N total soluble afl.	51.48	87.00	35.00	14.81
Carga Nitrógeno total soluble	0.08	0.15	0.03	0.03
Carga Nitrógeno total soluble hidráulica	14.58	25.37	7.82	5.08
N-NH4 afl.	45.43	66.00	32.00	9.53
porcentaje N-NH4	74.41	86.05	52.17	8.10
Carga N-NH4	0.07	0.12	0.03	0.02
Carga N-NH4 hidráulica	13.09	22.19	7.11	4.66
N-org soluble	6.04	21.00	0.00	5.84
Carga N-org soluble	8.25	28.77	0.00	8.10
N-org particulado	10.17	34.00	0.00	8.03
Nitrógeno orgánico total	16.22	44.00	6.00	7.82
P total afl.	11.92	31.00	4.70	5.47
Carga fósforo total	17.76	34.94	7.41	8.03
Carga fósforo total hidráulico	3.36	7.37	1.39	1.64
P total soluble afl.	8.52	17.00	3.30	3.44
Carga fósforo total soluble	12.49	24.66	5.55	4.66
Carga fósforo total soluble hidráulico	2.34	4.29	1.13	0.87
P-PO4 afl.	7.87	17.00	3.27	3.27
Porcentaje P-PO4 afl	68.96	98.10	29.54	17.58
Carga P-PO4	11.57	19.49	4.93	4.25
Carga P-PO4 Hidráulica	2.17	3.62	1.08	0.81
P-org soluble	0.65	2.52	0.00	0.68
Carga P-org soluble	0.92	5.17	0.00	1.10



P-org particulado	3.40	20.00	0.00	4.14
P-org total	4.05	21.84	0.17	4.46
DBO5/NKT	3.20	6.67	1.48	1.17
DQOsol/NKTs	2.88	4.48	1.56	0.80
DBO5/PT	18.27	40.43	7.86	8.38
DQOs/PTs	18.50	36.09	9.53	6.53
Sulfuros afl.	2.36	15.00	0.40	3.54
Carga sulfuros	3.08	14.44	0.36	3.71
Carga sulfuros hidráulico	0.59	2.60	0.06	0.70
Sulfatos afl.	265.17	376.00	154.00	51.75
Carga sulfatos	0.41	0.71	0.15	0.15
Carga sulfatos hidráulico	78.18	145.89	26.69	31.12
Tens. aniónicos afl.	4.53	12.00	1.10	2.29
Carga tensioactivos aniónicos	6.59	12.55	1.38	2.70
Carga tensioactivos aniónicos hidráulica	1.24	2.42	0.26	0.52
Carbohidratos	6.52	10.00	4.00	1.68
Carga Carbohidratos	9.97	19.39	5.23	3.69
Carga Carbohidratos hidráulica	1.88	4.30	0.99	0.76
Proteinas	55.30	95.00	38.00	13.53
Carga Proteinas	85.20	153.20	41.25	30.45
Carga Proteinas hidráulico	16.09	28.57	7.46	6.10
Aceites y grasas	20.70	37.00	7.00	8.01
Carga Aceites y grasas	29.84	51.40	14.09	9.99
Carga Aceites y grasas hidráulica	5.59	9.02	2.39	1.84
Acidos Grasos Volátiles	29.84	78.70	0.00	24.28
Carga Acidos Grasos Volátiles	44.54	107.08	0.00	34.57
Carga Acidos Grasos Volátiles hidráulica	8.17	18.62	0.00	6.29

II.II Parámetros del Licor de Mezcla

Tabla II-4 Valores de licor de mezcla Quart-Benager

	media	max	mini	desv
pH	7.44	7.79	7.05	0.18
Conductividad	2041.68	2740.00	1330.00	424.55
S.S.L.M (mg/L)	2460.12	3120.00	1790.00	386.14
S.S.V.L.M (mg/L)	1947.12	2498.00	1455.00	304.89
S.S.V.L.M (%)	79.20	87.00	68.00	3.67
SS recirculación (mg/L)	3821.00	4860.00	2730.00	594.52
SSV recirculación (mg/L)	3088.28	3937.00	2020.00	530.19
S.S. recirculación (%)	80.47	87.20	74.00	2.85
Relación de recirculación	1.59	2.19	1.01	0.33
n (dil)	0.00	0.00	0.00	0.00
V1	956.00	1000.00	820.00	55.38
V2	827.20	1000.00	500.00	140.22
V5 (ml/L)	602.40	950.00	240.00	217.72
V10	493.20	900.00	190.00	221.58
V15	411.43	700.00	260.00	186.50
V 20 (ml/L)	388.40	800.00	160.00	189.82
V 30 (ml/L)	339.20	720.00	140.00	159.61
IVFD (mL/g)	135.56	244.90	58.58	49.07
n (dil)	1.00	1.00	1.00	0.00
V1	950.00	1000.00	860.00	44.47
V2	754.00	900.00	440.00	131.34
V5 (ml/L)	360.00	440.00	260.00	55.78
V10	266.00	340.00	200.00	44.27
V15	200.00	220.00	180.00	20.00
V 20 (ml/L)	211.00	260.00	170.00	32.81
V 30 (ml/L)	191.00	240.00	160.00	27.67
IVFD (mL/g)	56.03	167.25	0.00	70.73
n (dil) PROBETA LARGA	0.39	1.00	0.00	0.50
V1	963.91	1000.00	890.00	31.73
V2	841.30	970.00	570.00	98.27
V5 (ml/L)	462.61	760.00	260.00	112.26
V10	340.87	510.00	200.00	72.92
V15	267.14	340.00	170.00	66.01
V 20 (ml/L)	262.39	380.00	160.00	53.25
V 30 (ml/L)	229.78	340.00	140.00	47.11
IVFD (mL/g)	119.65	178.14	0.00	39.93
NT (mg/L)	150.48	236.00	90.00	43.21
NTfiltrado (mg/L)	15.10	42.40	2.80	11.89
NTLM (mg/L)	135.38	216.00	87.20	36.10
NTLM (mg/g SSVLM)	71.00	107.55	41.06	21.03
PT (mg/L)	57.72	75.00	30.00	10.86
PT filtrado (mg/L)	0.86	5.70	0.00	1.31
PTLM (mg/L)	56.86	74.80	29.20	11.23
PTLM (mg/g SSVLM)	29.41	40.44	18.66	5.45
DQO TOTAL SSLM	2732.32	3340.00	1738.00	422.45
DQO filtrada SSLM	50.29	107.00	22.00	16.87
DQO SSLM	2682.03	3291.00	1631.00	426.66
g DQO/g SSVLM	1.38	1.63	0.96	0.15



Tabla II-5 Valores licor de mezcla Castellón línea 1

	media	max	mini	desv
pH	7.17	7.51	6.65	0.20
Conductividad	2968.48	4850.00	1875.00	760.79
SSLM	4055.22	6240.00	2640.00	1047.65
S.S.V.L.M (mg/L)	2919.78	4550.00	1840.00	783.41
S.S.V.L.M (%)	72.04	78.00	64.00	3.20
SS recirculación (mg/L)	5543.91	10760.00	2960.00	1708.81
SSV recirculación (mg/L)	4086.96	7780.00	2100.00	1265.62
S.S. recirculación (%)	73.65	81.00	66.00	3.21
Relación de recirculación	1.40	1.97	0.66	0.36
V 30 (ml/L)	578.64	920.00	300.00	198.48
IVF (n=0)	142.34	200.69	91.74	28.51
V 30 (ml/L)	227.62	400.00	160.00	67.96
IVFD (n=1)	112.03	160.64	81.14	20.19
V 30 (ml/L)	160.00	160.00	160.00	
IVFD (n=2)	102.56	102.56	102.56	
dif IVF	35.73	62.28	19.23	13.65
IVF	109.50	160.64	81.14	19.97
NTLM (mg/L)	157.11	295.00	75.40	61.34
NTLM (mg/g SSVLM)	54.43	95.82	29.55	18.80
PT (mg/L)				
PT filtrado (mg/L)				
PTLM (mg/L)	176.89	286.80	95.00	45.50
PTLM (mg/g SSVLM)	61.54	89.90	42.41	10.78
DQO TOTAL SSLM				
DQO filtrada SSLM				
DQO SSLM	4190.00	6619.00	2661.00	1186.05
g DQO/g SSVLM	1.43	1.77	1.26	0.11
temperatura	22.05	28.50	15.60	3.96

Tabla II-6 Valores licor de mezcla Castellón línea 2

	media	max	mini	desv
pH	7.20	7.60	6.85	0.21
Conductividad	2906.30	4840.00	1895.00	690.52
SSLM	4126.74	6800.00	2460.00	1156.81
S.S.V.L.M (mg/L)	2996.96	4920.00	1490.00	890.09
S.S.V.L.M (%)	72.22	81.00	61.00	4.74
SS recirculación (mg/L)	5816.09	8710.00	2760.00	1647.63
SSV recirculación (mg/L)	4208.70	6840.00	1960.00	1269.33
S.S. recirculación (%)	72.13	80.00	61.00	4.37
Relación de recirculación	1.43	1.99	0.93	0.30
n (dil)	0.00	0.00	0.00	0.00
V1	974.55	1000.00	860.00	39.61
V2	899.09	1000.00	480.00	147.81
V5 (ml/L)	767.73	1000.00	280.00	255.08
V10	704.77	985.00	220.00	287.01
V15	475.00	800.00	340.00	173.41
V 20 (ml/L)	636.82	980.00	180.00	300.10
V 30 (ml/L)	587.27	950.00	160.00	293.16
IVF (n=0)	136.19	227.50	64.33	51.07
n (dil)	1.00	1.00	1.00	0.00
V1	967.50	1000.00	860.00	33.37
V2	812.50	980.00	440.00	134.83
V5 (ml/L)	529.38	900.00	260.00	191.05
V10	419.38	780.00	200.00	167.99
V15	245.00	270.00	220.00	35.36
V 20 (ml/L)	336.88	600.00	160.00	129.75
V 30 (ml/L)	296.88	520.00	150.00	108.92
IVFD (n=1)	129.55	213.99	75.47	40.01
V 30 (ml/L)	173.33	180.00	160.00	11.55
IVFD (n=2)	133.49	148.15	105.88	23.93
dif IVF	45.52	79.77	17.61	19.44
IVF	108.74	160.00	64.00	28.71
NTLM (mg/L)	162.17	384.00	59.60	89.13
NTLM (mg/g SSVLM)	51.92	109.09	31.02	23.12
PTLM (mg/L)	170.16	320.00	76.70	63.79
PTLM (mg/g SSVLM)	56.96	76.17	27.05	12.73
DQO SSLM	4262.22	7111.00	1985.00	1294.35
g DQO/g SSVLM	1.42	1.53	1.30	0.06
temperatura	22.09	29.10	15.40	4.05

II.III Parámetros Operacionales

Tabla II-7 Variables operacionales Quart-Benager

VARIABLES OPERACIONALES	UNIDADES	MEDIA	MÍNIMO	MAXIMO	DESVIACION
Caudal 2	m ³	28264	23929	34520	3272
Caudal 1	m ³	35054	26107	46406	5457
Caudal 0	m ³	41751	25939	62230	10566
Caudal 0,1,2	m ³	35023	28966	44562	4844
Carga hidráulica superficial 2	m ³ /m ² . h	0.59	0.44	0.84	0.12
Carga hidráulica superficial 1	m ³ /m ² . h	0.72	0.53	1.12	0.13
Carga hidráulica superficial 0	m ³ /m ² . h	0.85	0.57	1.22	0.18
Carga hidráulica superficial 0,1,2	m ³ /m. h	0.72	0.53	0.93	0.10
Carga hidráulica sobre vertedero 2	m ³ /m. h	3.8	2.9	5.6	0.8
Carga hidráulica sobre vertedero 1	m ³ /m. h	4.7	2.9	7.6	1.0
Carga hidráulica sobre vertedero 0	m ³ /m. h	5.5	3.2	8.3	1.5
Carga hidráulica sobre vertedero 0,1,2	m ³ /m. h	4.6	3.0	6.2	0.9
Tiempo retención hidráulico 2	h	6.1	4.0	7.8	1.1
T.R.H 1	h	4.9	3.0	6.3	0.8
T.R.H 0	h	4.3	2.8	6.8	1.1
TRH3	h	5.1	3.9	6.5	0.7
CM1	Kg DBO5/kg SSVLM.d				
CM2a	Kg DBO5/kg SSVLM.d				
CM2b	Kg DBO5/kg SSVLM.d				
CM3	Kg DBO5/kg SSVLM.d	0.20	0.08	0.47	0.09
Carga volumétrica 2	Kg DBO5/m ³	#¡DIV/0!	0.00	0.00	#¡DIV/0!
C. Volumétrica 1	Kg DBO5/m ³	#¡DIV/0!	0.00	0.00	#¡DIV/0!
C. Volumétrica 0	Kg DBO5/m ³	#¡DIV/0!	0.00	0.00	#¡DIV/0!
C. Volumétrica 0,1,2	Kg DBO5/m ³	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
Tiempo retención hidráulico 2	h	20.4	14.1	26.2	3.3
T.R.H 1	h	16.5	12.6	24.8	2.5
T.R.H 0	h	14.3	8.7	25.0	3.3
TRHrea3	h	17.0	13.5	22.0	2.0
EF1	días	39.9	3.0	785.5	155.4
EF2	días	11.9	2.9	52.1	10.3
EF3	días	12.0	3.5	35.7	7.2
EF4	días	11.0	4.6	28.0	5.7
EF5	días	10.8	5.1	31.9	6.1
EF6	días	10.8	5.2	29.0	5.7
EF7	días	10.8	5.3	30.9	6.1
Oxígeno 2 (< 0,8 ppm)	%	29	0	78	17
Oxígeno 2 (0,8-2 ppm)	%	63	22	96	19
Oxígeno 2 (>2 ppm)	%	8	0	48	15
Oxígeno 1 (< 0,8 ppm)	%	35	4	75	19
Oxígeno 1 (0,8-2 ppm)	%	61	0	94	22
Oxígeno 1 (>2 ppm)	%	5	0	38	9
Oxígeno 0 (< 0,8 ppm)	%	36	0	92	25
Oxígeno 0 (0,8-2 ppm)	%	61	8	96	24
Oxígeno 0 (>2 ppm)	%	3	0	35	9
Oxígeno 0 (< 0,8 ppm)	%	33	5	69	18
Oxígeno 0 (0,8-2 ppm)	%	62	12	95	19
Oxígeno 0 (>2 ppm)	%	5	0	40	10
PROMEDIO DE OXIGENO	ppm				
Tº reactor	ºC	21	14	29	4
Carga hidráulica superficial 2	m ³ /m ² . h	0.40	0.30	0.54	0.07
Carga hidráulica superficial 1	m ³ /m ² . h	0.50	0.32	0.73	0.10
Carga hidráulica superficial 0	m ³ /m ² . h	0.59	0.38	0.83	0.14
Carga hidráulica superficial 0,1,2	m ³ /m ² . h	0.49	0.36	0.65	0.08
Carga hidráulica sobre vertedero 2	m ³ /m. h	2.95	0.78	4.55	1.06

Carga hidráulica sobre vertedero 1	m ³ /m. h	3.74	0.81	6.12	1.50
Carga hidráulica sobre vertedero 0	m ³ /m. h	4.47	0.78	6.92	1.90
Carga hidráulica sobre vertedero 0	m ³ /m. h	3.72	0.86	5.42	1.40
Carga de sólidos por superficie 2	Kg SS/m ² . h	0.89	0.58	1.26	0.18
Carga de sólidos por superficie 1	Kg SS/m ² . h	1.12	0.62	1.63	0.26
Carga de sólidos por superficie 0	Kg SS/m ² . h	1.30	0.78	1.93	0.38
Carga de sólidos por superficie 0,1,2	Kg SS/m ² . h	1.10	0.74	1.54	0.22
Carga de sólidos sobre vertedero 2	Kg SS/m. h	7.5	4.8	10.6	1.5
Carga de sólidos sobre vertedero 1	Kg SS/m. h	9.3	5.2	13.6	2.2
Carga de sólidos sobre vertedero 0	Kg SS/m. h	10.9	6.5	16.1	3.2
Carga de sólidos sobre vertedero 0,1,2	Kg SS/m. h	9.2	6.2	12.9	1.8
Tasa de recirculación 2	%	145	85	225	35
T.R. 1	%	132	92	172	19
T.R. 0	%	126	97	177	21
T.R. 0,1,2	%	134	94	179	20
Tiempo retención hidráulico 2	horas	8.0	5.5	10.9	1.6
T.R.H secundarios 1	horas	6.5	4.2	9.8	1.4
T.R.H secundarios 0	horas	5.8	3.8	8.4	1.5
T.R.H secundarios 0,1,2	horas	6.8	5.0	9.2	1.2

Tabla II-8 Variables operacionales Castellón 1

VARIABLES OPERACIONALES	UNIDADES	MEDIA	MAXIMO	MINIMO	DESV
Caudal 2 (m ³)	m ³	19088	23424	16161	1731
Caudal 1	m ³	19676	25355	16385	2318
Caudal 0	m ³	19680	22065	16813	1612
Caudal 0,1,2	m ³	19481	22527	16953	1693
Carga hidráulica superficial 2 (m ³ /m ² . h)	m ³ /m ² . h	0.62	0.79	0.32	0.11
Carga hidráulica superficial 1	m ³ /m ² . h	0.64	0.76	0.32	0.12
Carga hidráulica superficial 0	m ³ /m ² . h	0.64	0.81	0.29	0.12
Carga hidráulica superficial 0,1,2	m ³ /m. h	0.63	0.77	0.32	0.11
Carga hidráulica sobre vertedero 2 (m ³ /m. h)	m ³ /m. h	4.56	5.55	3.83	0.48
Carga hidráulica sobre vertedero 1	m ³ /m. h	4.64	5.33	3.88	0.49
Carga hidráulica sobre vertedero 0	m ³ /m. h	4.68	5.63	3.95	0.47
Carga hidráulica sobre vertedero 0,1,2	m ³ /m. h	4.62	5.35	4.01	0.44
Tiempo retención hidráulico 2 (horas)	h	4.43	5.21	3.55	0.45
T.R.H 1 (h)	h	4.35	5.10	3.69	0.48
T.R.H 0 (h)	h	4.32	5.50	3.50	0.48
T.R.H 0,1,2	h	4.37	5.00	3.69	0.43
Carga máscica 2 (Kg DBO ₅ /kg SSVLM.d)	Kg DBO ₅ /kg SSVLM.d	0.32	0.48	0.17	0.08
C. máscica 1	Kg DBO ₅ /kg SSVLM.d	0.31	0.46	0.19	0.08
C. máscica 0	Kg DBO ₅ /kg SSVLM.d	0.30	0.55	0.17	0.09
C. máscica	Kg DBO ₅ /kg SSVLM.d	0.31	0.43	0.21	0.07
Carga volumétrica 2 (Kg DBO ₅ /m ³)	Kg DBO ₅ /m ³	0.81	1.20	0.47	0.23
C. Volumétrica 1	Kg DBO ₅ /m ³	0.76	1.30	0.43	0.26
C. Volumétrica 0	Kg DBO ₅ /m ³	0.82	1.34	0.42	0.27
C. Volumétrica 0,1,2	Kg DBO ₅ /m ³	0.80	1.27	0.48	0.23
Tiempo retención hidráulico 2 (horas)	h	5.6	6.6	4.5	0.6
T.R.H 1	h	5.5	6.5	4.7	0.6
T.R.H 0 (h)	h	5.4	6.3	4.5	0.5
T.R.H(h)	h	5.5	6.3	4.7	0.5
EF3	días	5.8	11.0	3.0	1.7
Tº reactor	ºC	22	29	16	4
DOSIS OZONO (Kg O ₃ /d) (2)	Kg O ₃ /d	17.4	55.3	0.0	21.0
DOSIS OZONO (1)	Kg O ₃ /d	18.4	50.9	0.0	20.5
DOSIS OZONO (0)	Kg O ₃ /d	19.8	50.2	0.0	21.8
DOSIS OZONO 0,1,2	Kg O ₃ /d	18.5	47.8	0.0	20.3
Carga hidráulica superficial 2 (m ³ /m ² . h)	m ³ /m ² . h	0.60	0.74	0.51	0.06
Carga hidráulica superficial 1	m ³ /m ² . h	0.62	0.71	0.52	0.07
Carga hidráulica superficial 0	m ³ /m ² . h	0.62	0.75	0.50	0.07
Carga hidráulica superficial 0,1,2	m ³ /m ² . h	0.62	0.71	0.53	0.06
Carga hidráulica sobre vertedero 2 (m ³ /m. h)	m ³ /m. h	4.4	5.4	3.7	0.4
Carga hidráulica sobre vertedero 1	m ³ /m. h	4.5	5.2	3.8	0.5
Carga hidráulica sobre vertedero 0	m ³ /m. h	4.5	5.4	3.8	0.4



Carga hidráulica sobre vertedero 0,1,2	m3/m. h	4.5	5.2	3.9	0.4
Carga de sólidos por superficie 2 (Kg SS/m ² . h)	Kg SS/m2. h	2.2	4.0	1.2	0.6
Carga de sólidos por superficie 1	Kg SS/m2. h	2.2	3.5	1.2	0.6
Carga de sólidos por superficie 0	Kg SS/m2. h	2.4	4.1	1.4	0.7
Carga de sólidos por superficie 0,1,2	Kg SS/m2. h	2.3	3.5	1.4	0.6
Carga de sólidos sobre vertedero 2 (Kg SS/m. h)	Kg SS/m. h	16.3	28.7	8.5	4.5
Carga de sólidos sobre vertedero 1	Kg SS/m. h	15.7	25.2	8.8	4.5
Carga de sólidos sobre vertedero 0	Kg SS/m. h	16.7	29.5	10.3	4.9
Carga de sólidos sobre vertedero 0,1,2	Kg SS/m. h	16.2	25.0	9.9	4.0
Tasa de recirculación 2 (%)	%	128	165	99	19
T.R. 1	%	124	165	86	21
T.R. 0	%	126	162	99	19
T.R. 0,1,2	%	126	159	103	19
Tiempo retención hidráulico 2 (horas)	horas	5.0	5.9	4.1	0.5
T.R.H secundarios 1 (h)	horas	4.9	5.8	4.2	0.5
T.R.H secundarios 0 (h)	horas	4.9	5.7	4.0	0.5
T.R.H secundarios 0,1,2	horas	4.9	5.6	4.2	0.5
Oxígeno 1 (2)	%				
< 0,8 ppm	%	35	100	0	29
0,8-2 ppm	%	45	100	0	22
>2 ppm	%	20	71	0	24
Oxígeno 2 (2)	%				
< 0,8 ppm	%	1	20	0	4
0,8-2 ppm	%	33	80	0	28
>2 ppm	%	65	100	0	30
Oxígeno 3 (2)	%				
< 0,8 ppm	%	1	21	0	4
0,8-2 ppm	%	42	85	8	22
>2 ppm	%	57	92	2	24
Oxígeno 1 (1)	%				
< 0,8 ppm	%	43	96	0	28
0,8-2 ppm	%	39	67	4	17
>2 ppm	%	18	67	0	24
Oxígeno 2 (1)	%				
< 0,8 ppm	%	1	10	0	3
0,8-2 ppm	%	37	96	0	25
>2 ppm	%	62	100	2	27
Oxígeno 3 (1)	%				
< 0,8 ppm	%	0	2	0	0
0,8-2 ppm	%	41	69	4	21
>2 ppm	%	59	96	31	21
Oxígeno 1 (0)	%				
< 0,8 ppm	%	51	96	0	29
0,8-2 ppm	%	36	69	4	18
>2 ppm	%	13	73	0	23
Oxígeno 2 (0)	%				
< 0,8 ppm	%	2	25	0	6
0,8-2 ppm	%	48	94	0	29
>2 ppm	%	51	100	6	31
Oxígeno 3 (0)	%				
< 0,8 ppm	%	1	25	0	6
0,8-2 ppm	%	45	92	4	24
>2 ppm	%	54	96	8	25
Oxígeno 1 (0,1,2)	%				
< 0,8 ppm	%	43	93	0	27
0,8-2 ppm	%	40	76	7	16
>2 ppm	%	17	65	0	21
Oxígeno 2 (0,1,2)	%				
< 0,8 ppm	%	1	14	0	3
0,8-2 ppm	%	40	83	0	25
>2 ppm	%	59	100	8	27
Oxígeno 3 (0,1,2)	%				
< 0,8 ppm	%	1	9	0	2
0,8-2 ppm	%	43	81	6	21
>2 ppm	%	56	94	19	22
Oxígeno TOTAL (0,1,2)					
< 0,8 ppm	%	15	34	0	10
0,8-2 ppm	%	41	63	14	13
>2 ppm	%	44	86	10	21
OXÍGENO PROMEDIADO					

Tabla II-9 Variables operacionales Castellón 2

VARIABLES OPERACIONALES	UNIDADES	MEDIA	MAXIMO	MINIMO	DESV
Caudal 2	m3	21247	27097	12011	3544
Caudal 1	m3	22212	27540	10637	3906
Caudal 0	m3	22052	27253	13066	3224
Caudal 0,1,2	m3	21837	25325	12320	3333
Carga hidráulica superficial 2	m3/m2. h	0.74	0.92	0.42	0.10
Carga hidráulica superficial 1	m3/m2. h	0.76	0.93	0.40	0.11
Carga hidráulica superficial 0	m3/m2. h	0.77	0.97	0.40	0.11
Carga hidráulica superficial 0,1,2	m3/m. h	0.76	0.89	0.41	0.10
Carga hidráulica sobre vertedero 2	m3/m. h	5.3	6.4	4.7	0.4
Carga hidráulica sobre vertedero 1	m3/m. h	5.5	6.5	4.4	0.5
Carga hidráulica sobre vertedero 0	m3/m. h	5.5	6.8	4.3	0.5
Carga hidráulica sobre vertedero 0,1,2	m3/m. h	5.4	6.0	4.7	0.4
Tiempo retención hidráulico 2	h	4.5	5.4	3.8	0.5
T.R.H 1	h	4.4	5.4	3.7	0.5
T.R.H 0	h	4.3	5.6	3.6	0.4
T.R.H 0,1,2	h	5.4	6.2	4.9	0.4
Carga másica 2	Kg DBO5/kg SSVLM.d	0.30	0.70	0.15	0.13
C. másica 1	Kg DBO5/kg SSVLM.d	0.27	0.50	0.10	0.11
C. másica 0	Kg DBO5/kg SSVLM.d	0.30	0.80	0.17	0.14
C. másica	Kg DBO5/kg SSVLM.d	0.29	0.60	0.16	0.10
Carga volumétrica 2	Kg DBO5/m3	0.76	1.56	0.39	0.26
C. Volumétrica 1	Kg DBO5/m3	0.71	1.20	0.47	0.17
C. Volumétrica 0	Kg DBO5/m3	0.88	1.73	0.40	0.33
C. Volumétrica 0,1,2	Kg DBO5/m3	0.79	1.35	0.50	0.21
Tiempo retención hidráulico 2	h	5.5	6.6	4.5	0.4
T.R.H 1	h	5.4	6.6	4.5	0.5
T.R.H 0	h	5.4	6.7	4.5	0.5
T.R.H 0,1,2	h	5.4	6.2	4.9	0.4
EF3	días	7.3	13.4	3.1	2.7
Tº reactor	ºC	22	29	15	4
DOSIS OZONO (2)	Kg O3/d	9	49	0	16
DOSIS OZONO (1)	Kg O3/d	8	48	0	15
DOSIS OZONO (0)	Kg O3/d	9	49	0	17
DOSIS OZONO (0,1,2)	Kg O3/d	9	47	0	16
Carga hidráulica superficial 2 (m³/m². h)	m3/m2. h	0.76	0.92	0.62	0.07
Carga hidráulica superficial 1	m3/m2. h	0.79	0.93	0.67	0.07
Carga hidráulica superficial 0	m3/m2. h	0.78	0.93	0.60	0.08
Carga hidráulica superficial 0,1,2	m3/m2. h	0.77	0.86	0.68	0.05
Carga hidráulica sobre vertedero 2 (m³/m. h)	m3/m. h	5.3	6.4	4.4	0.4
Carga hidráulica sobre vertedero 1	m3/m. h	5.5	6.5	4.4	0.5
Carga hidráulica sobre vertedero 0	m3/m. h	5.5	6.5	4.3	0.5
Carga hidráulica sobre vertedero 0,1,2	m3/m. h	5.4	6.0	4.7	0.4
Carga de sólidos por superficie 2 (Kg SS/m². h)	Kg SS/m2. h	2.9	4.3	1.3	0.7
Carga de sólidos por superficie 1	Kg SS/m2. h	3.1	4.1	1.8	0.5
Carga de sólidos por superficie 0	Kg SS/m2. h	3.3	5.2	1.1	0.9
Carga de sólidos por superficie 0,1,2	Kg SS/m2. h	3.1	4.1	1.4	0.6
Carga de sólidos sobre vertedero 2 (Kg SS/m. h)	Kg SS/m. h	20	30	9	5
Carga de sólidos sobre vertedero 1	Kg SS/m. h	22	28	12	4
Carga de sólidos sobre vertedero 0	Kg SS/m. h	22	35	8	6
Carga de sólidos sobre vertedero 0,1,2	Kg SS/m. h	21	29	10	4
Tasa de recirculación 2 (%)	%	102	138	87	13
T.R. 1	%	99	144	90	12
T.R. 0	%	97	136	83	11
T.R. 0,1,2	%	99	139	91	11
Tiempo retención hidráulico 2 (horas)	horas	5.4	6.5	4.4	0.5
T.R.H secundarios 1 (h)	horas	5.3	6.5	4.3	0.5
T.R.H secundarios 0 (h)	horas	5.2	6.5	4.3	0.5
T.R.H secundarios 0,1,2	horas	5.3	6.3	4.7	0.4
Oxígeno 1 (2)	%				
< 0,8 ppm	%	53	96	0	29
0,8-2 ppm	%	30	55	3	15
>2 ppm	%	17	61	0	18
Oxígeno 2 (2)	%				
< 0,8 ppm	%	11	64	0	19



0,8-2 ppm	%	38	59	7	16
>2 ppm	%	52	92	1	25
Oxigeno 3 (2)	%				
< 0,8 ppm	%	5	32	0	10
0,8-2 ppm	%	41	59	1	16
>2 ppm	%	54	99	8	19
Oxigeno 1 (1)	%				
< 0,8 ppm	%	52	100	5	27
0,8-2 ppm	%	29	56	0	13
>2 ppm	%	19	68	0	19
Oxigeno 2 (1)	%				
< 0,8 ppm	%	13	56	0	18
0,8-2 ppm	%	44	89	10	20
>2 ppm	%	44	90	1	27
Oxigeno 3 (1)	%				
< 0,8 ppm	%	5	34	0	10
0,8-2 ppm	%	43	68	3	19
>2 ppm	%	52	97	24	22
Oxigeno 1 (0)	%				
< 0,8 ppm	%	53	98	6	26
0,8-2 ppm	%	28	53	2	13
>2 ppm	%	18	73	0	20
Oxigeno 2 (0)	%				
< 0,8 ppm	%	7	51	0	13
0,8-2 ppm	%	46	69	11	16
>2 ppm	%	47	89	11	22
Oxigeno 3 (0)	%				
< 0,8 ppm	%	2	20	0	5
0,8-2 ppm	%	47	69	13	14
>2 ppm	%	51	88	26	16
Oxigeno 1 (0,1,2)	%				
< 0,8 ppm	%	52	99	0	27
0,8-2 ppm	%	29	49	1	11
>2 ppm	%	19	61	0	18
Oxigeno 2 (0,1,2)	%				
< 0,8 ppm	%	10	56	0	15
0,8-2 ppm	%	42	75	13	16
>2 ppm	%	47	87	4	23
Oxigeno 3 (0,1,2)	%				
< 0,8 ppm	%	4	25	0	7
0,8-2 ppm	%	44	63	13	15
>2 ppm	%	52	87	25	16
Oxigeno TOTAL (0,1,2)					
< 0,8 ppm	%	22	50	0	14
0,8-2 ppm	%	38	49	21	9
>2 ppm	%	39	73	13	18

III Anexo: Gráficas

III.I Variables Físico-Químicas

III.I.I CN_orgs frente a FI Gordonia

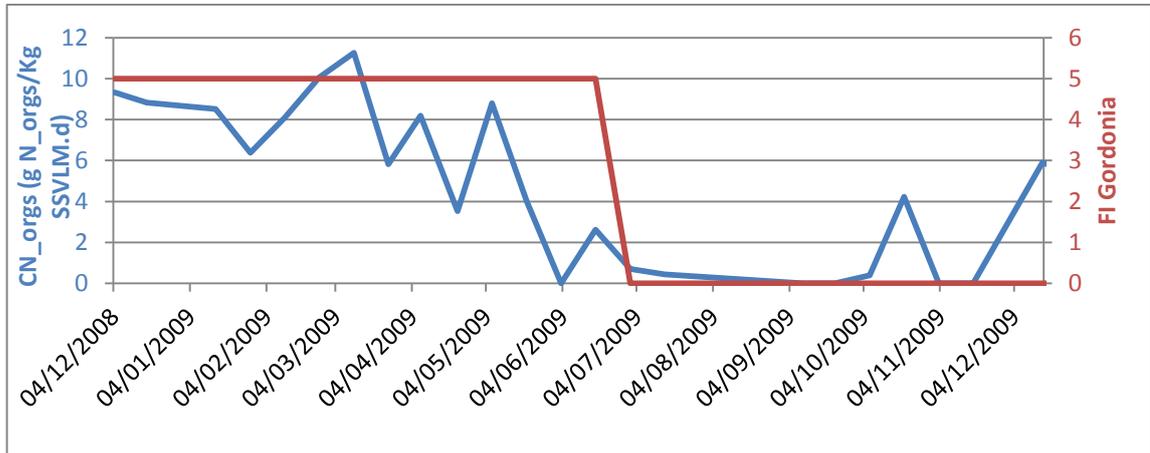


Figura 6-7 Carga de Nitrógeno Orgánico Soluble (CN orgs), nivel de Gordonia. Quart-Benager.

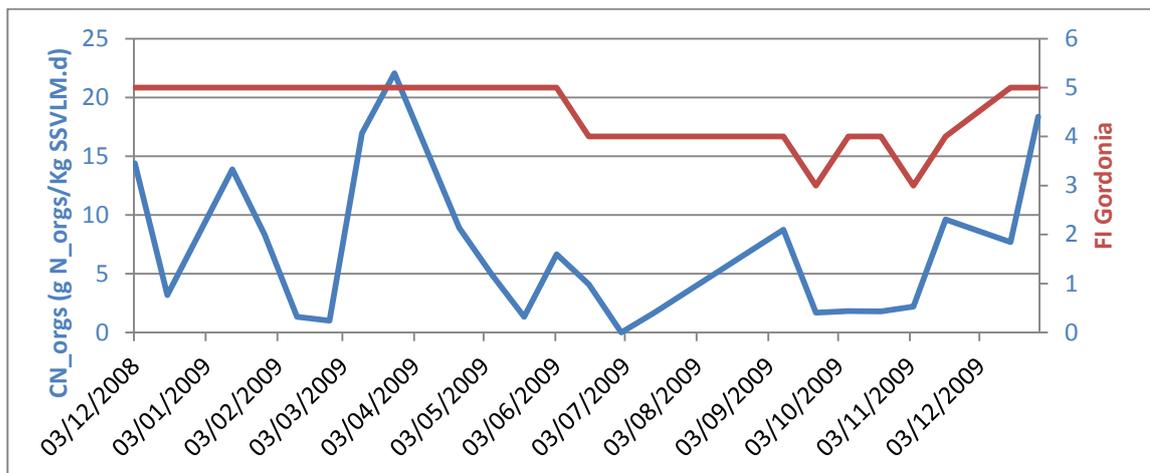


Figura 6-8 Carga de Nitrógeno Orgánico Soluble (CN orgs), nivel de Gordonia. Castellón L1.

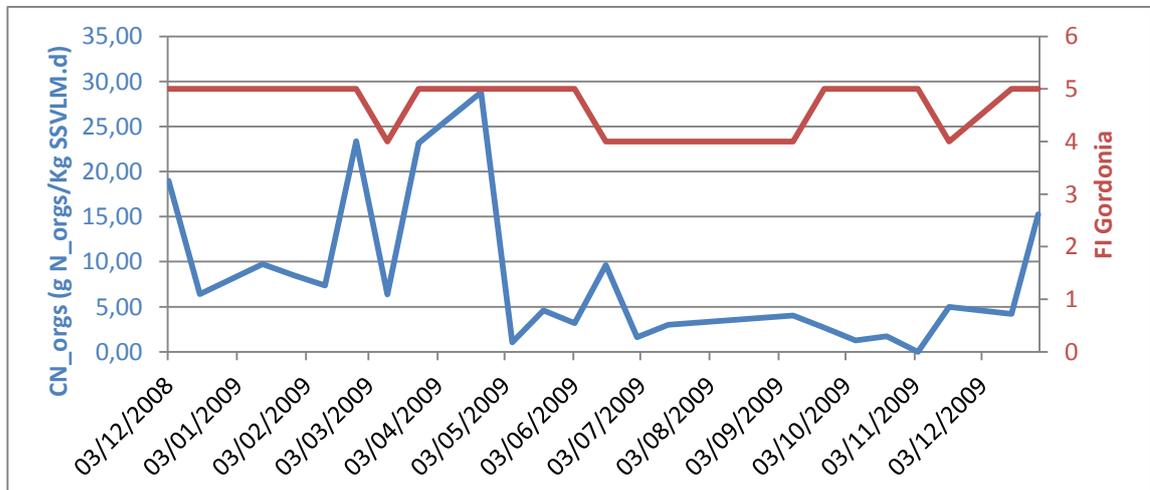


Figura 6-9 Carga de Nitrógeno Orgánico Soluble (CN orgs), nivel de Gordonia. Castellón L2.

III.I.II CP_orgs frente a FI Gordonia

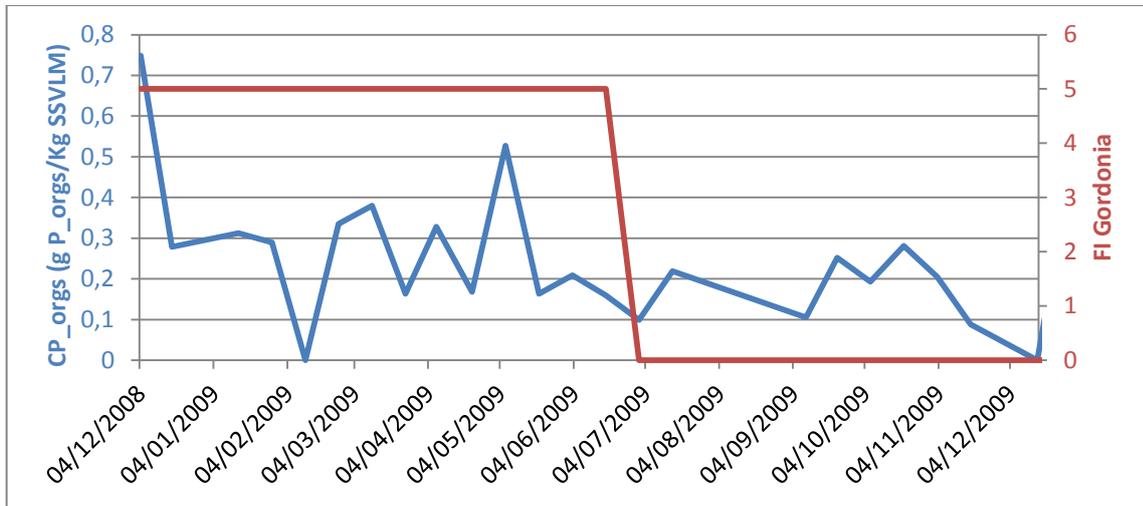


Figura 6-10 Carga de Fósforo Orgánico Soluble (CP orgs), nivel de Gordonia. Quart-Benager.

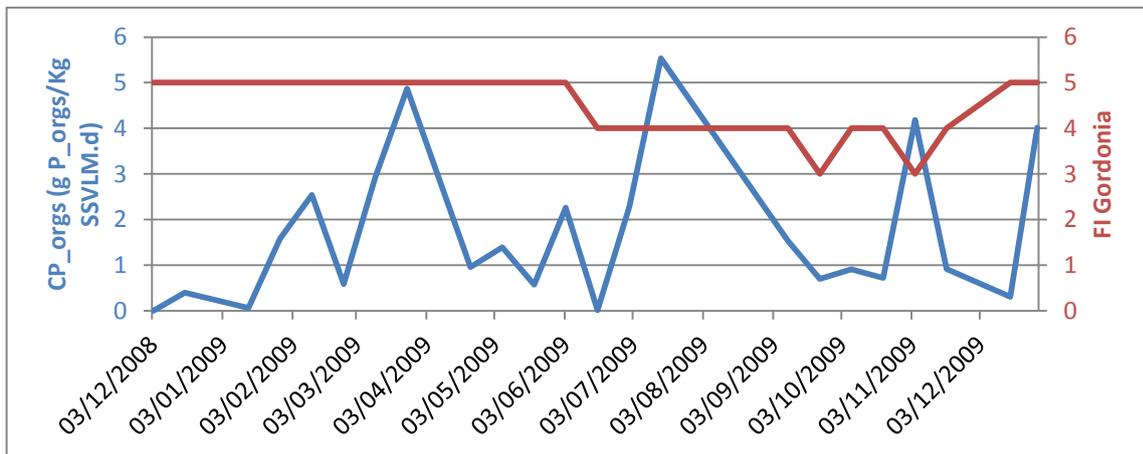


Figura 6-11 Carga de Fósforo Orgánico Soluble (CP orgs), nivel de Gordonia. Castellón L1.

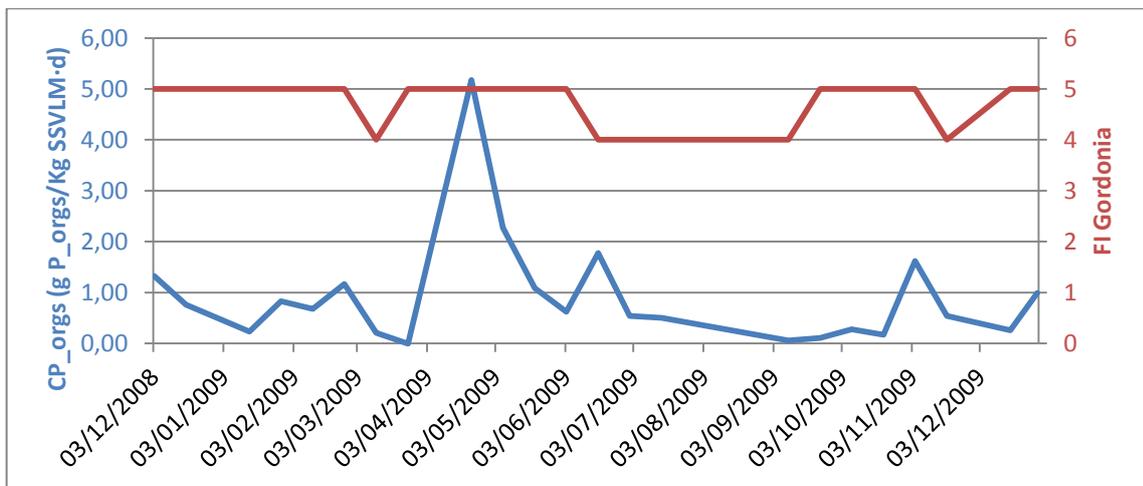


Figura 6-12 Carga de Fósforo Orgánico Soluble (CP orgs), nivel de Gordonia. Castellón L2.

III.I.III AG frente a FI Gordonia

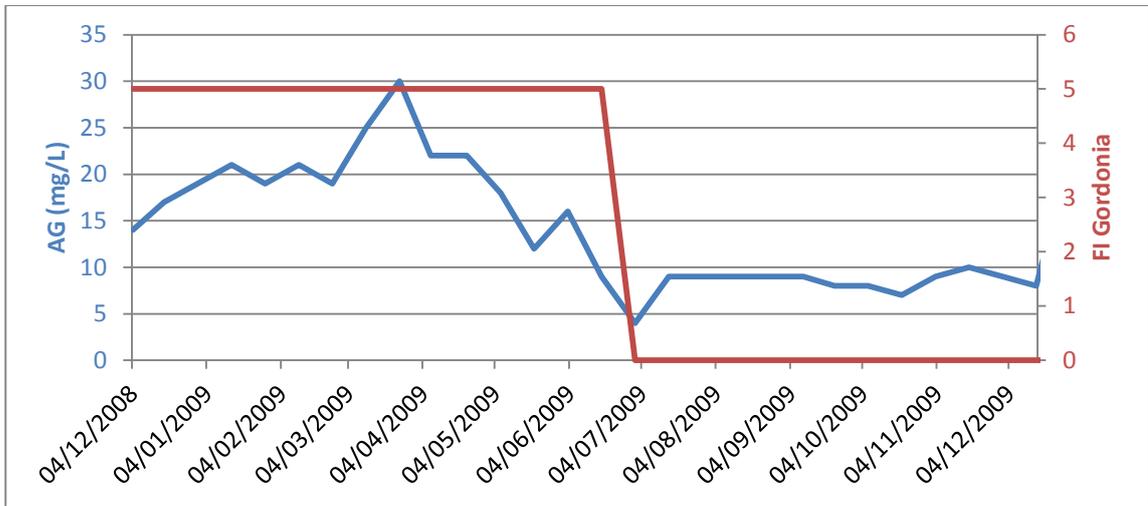


Figura 6-13 Aceites y Grasas (AG), nivel de Gordonia. Quart-Benager.

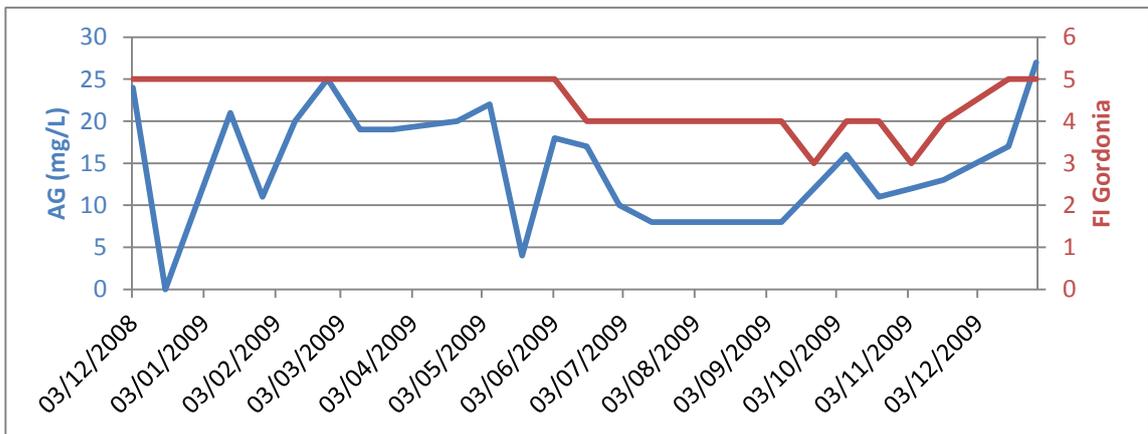


Figura 6-14 Aceites y Grasas (AG), nivel de Gordonia. Castellón L1.

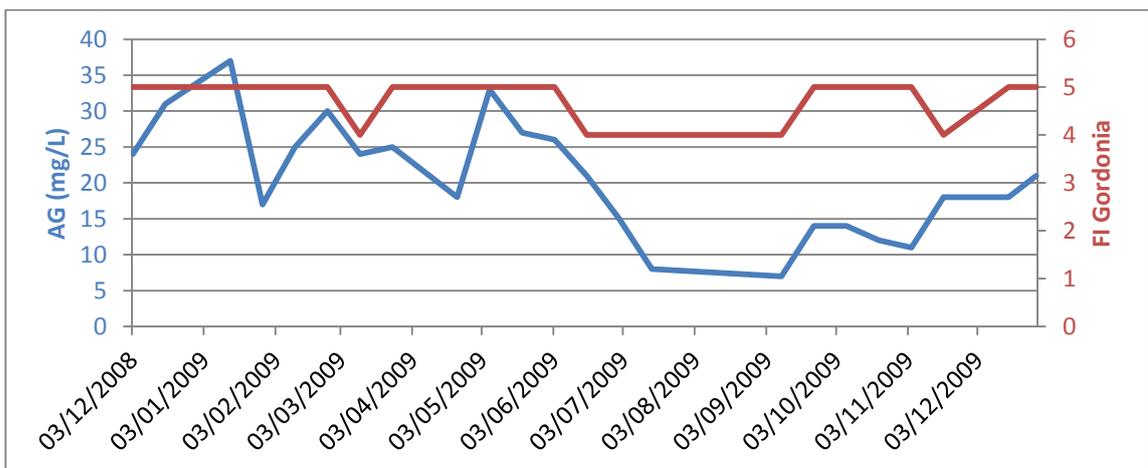


Figura 6-15 Aceites y Grasas (AG), nivel de Gordonia. Castellón L2.

III.I.IV Carbohidratos frente a FI Gordonia

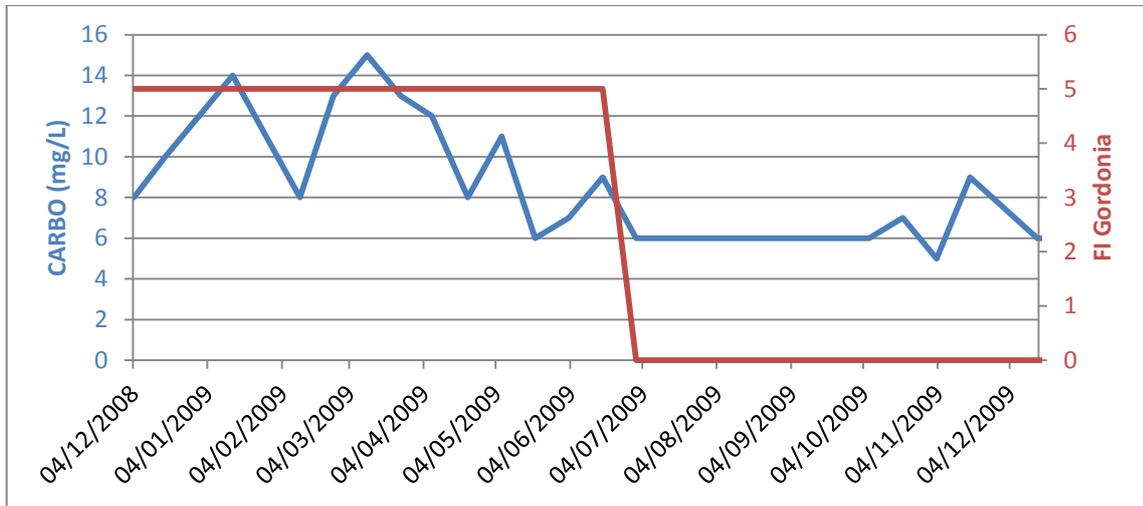


Figura 6-16 Carbohidratos (CARBO), nivel de Gordonia. Quart-Benager.

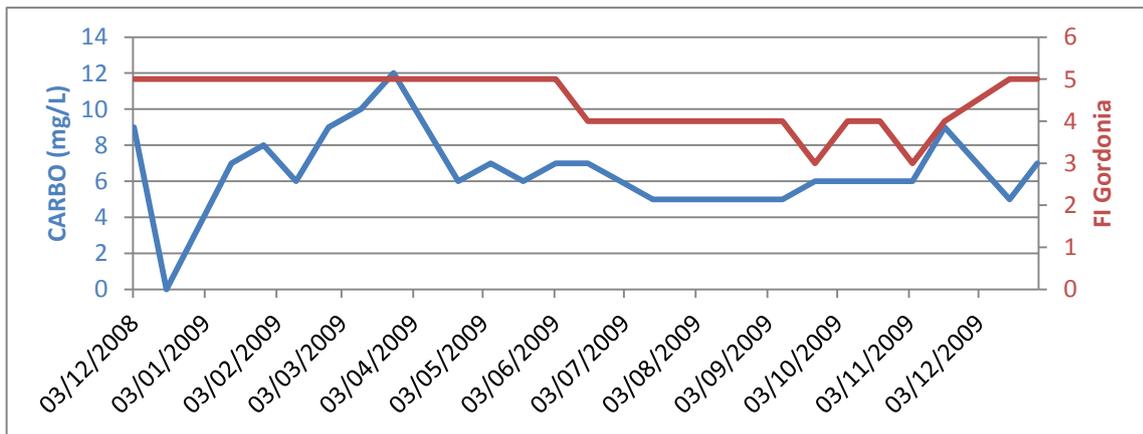


Figura 6-17 Carbohidratos (CARBO), nivel de Gordonia. Castellón L1.

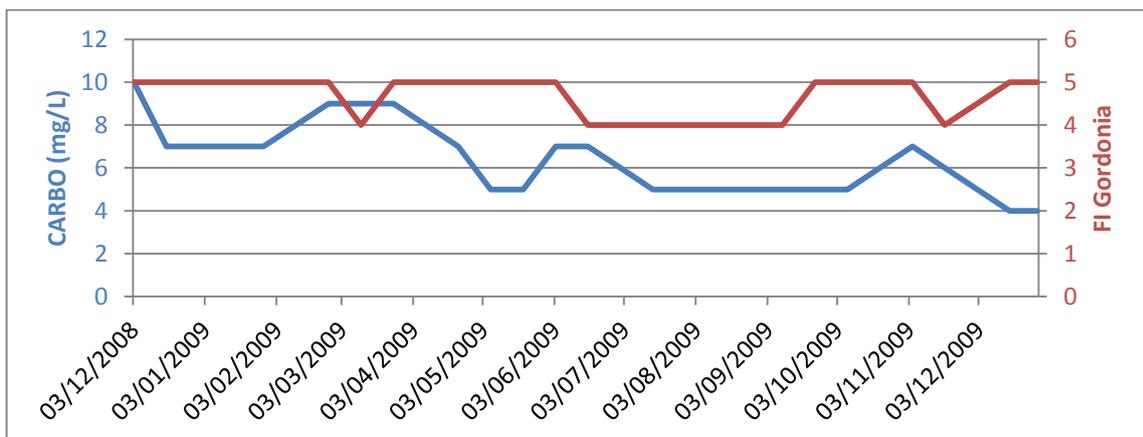


Figura 6-18 Carbohidratos (CARBO), nivel de Gordonia. Castellón L2.

III.I.V Proteínas frente a FI Gordonia

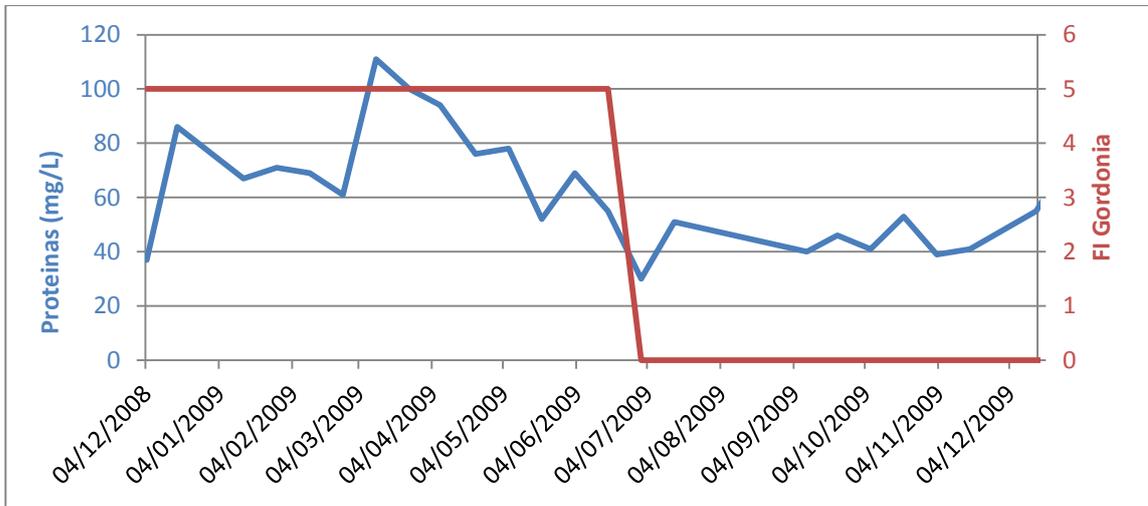


Figura 6-19 Proteínas (PROTE), nivel de Gordonia. Quart-Benager.

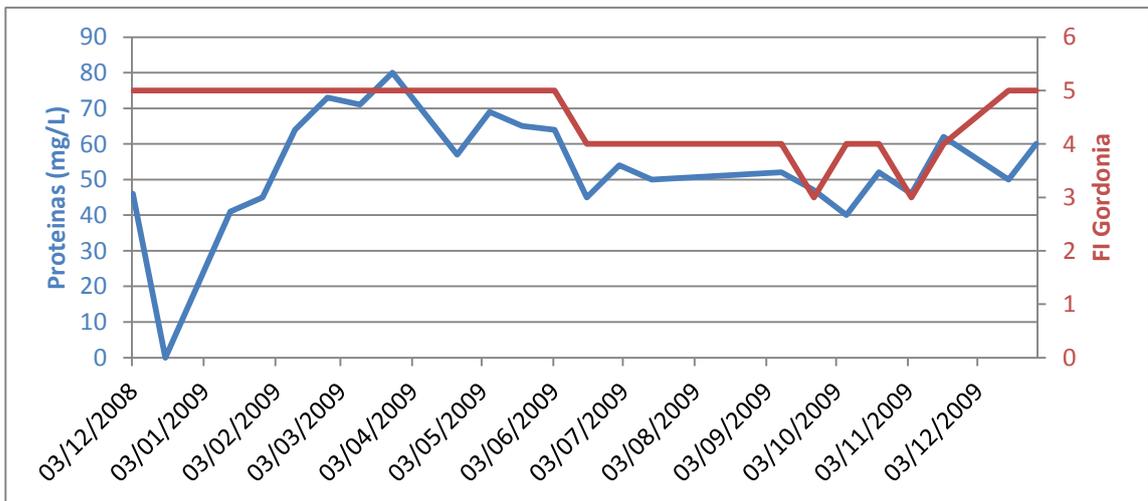


Figura 6-20 Proteínas (PROTE), nivel de Gordonia. Castellón L1.

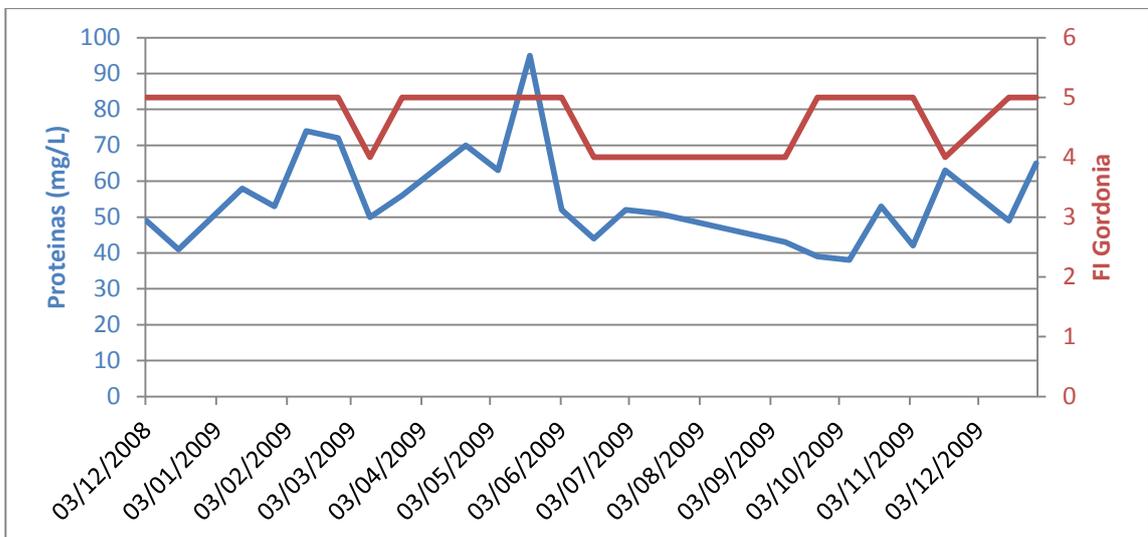


Figura 6-21 Proteínas (PROTE), nivel de Gordonia. Castellón L2.

III.I.VI CNTs frente a FI Gordonia

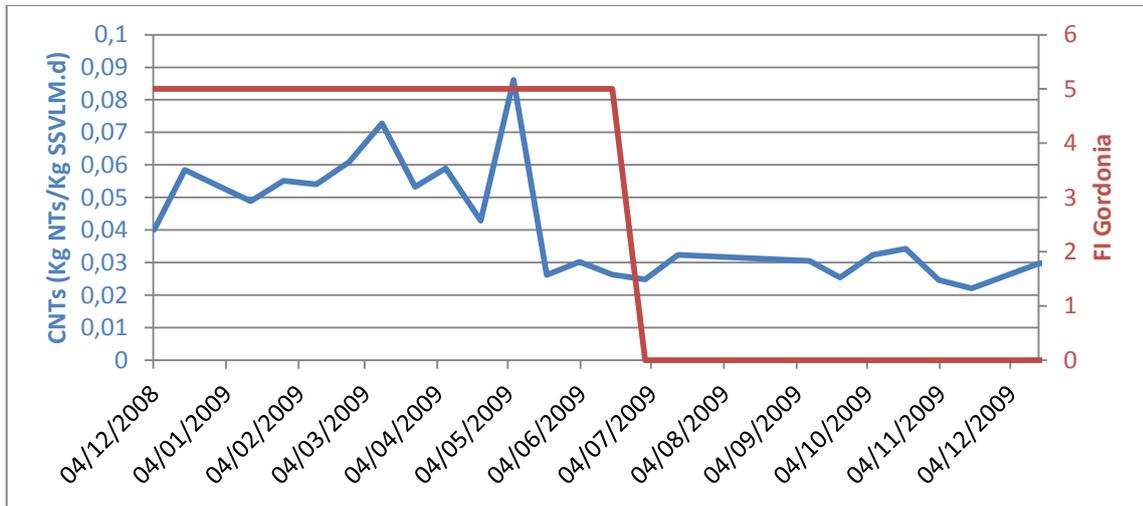


Figura 6-22 Carga de Nitrógeno Total soluble (CNTs), nivel de Gordonia. Quart-Benager.

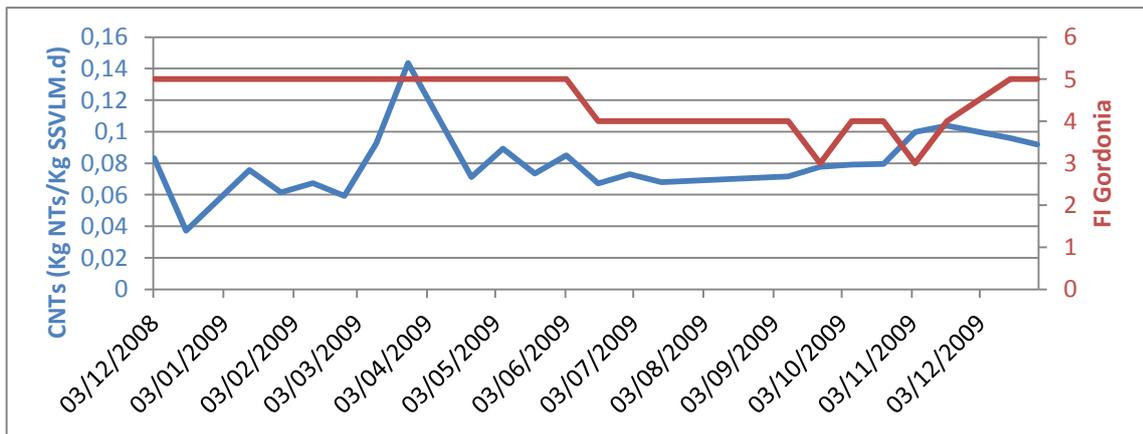


Figura 6-23 Carga de Nitrógeno Total soluble (CNTs), nivel de Gordonia. Castellón L1.

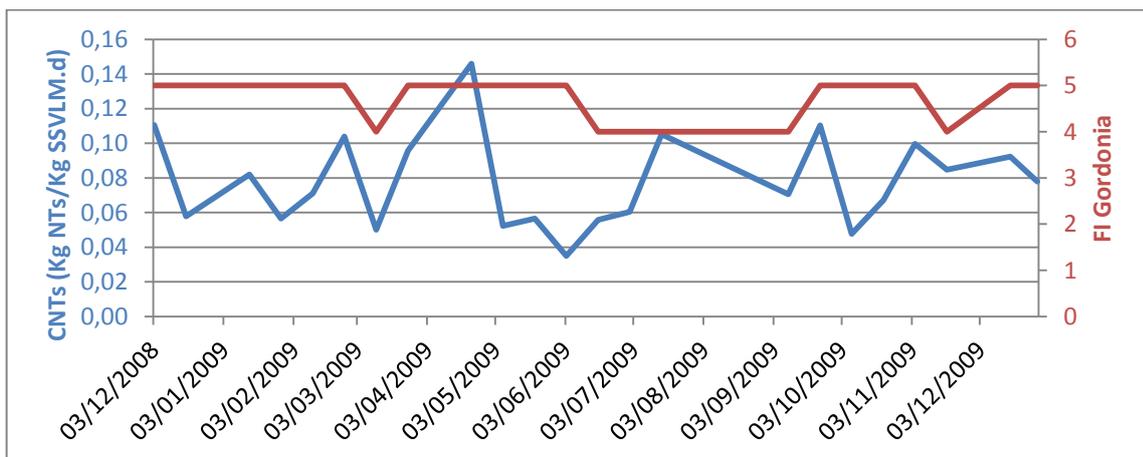


Figura 6-24 Carga de Nitrógeno Total soluble (CNTs), nivel de Gordonia. Castellón L2.

III.I.VII CP_PO4 frente a FI Gordonia

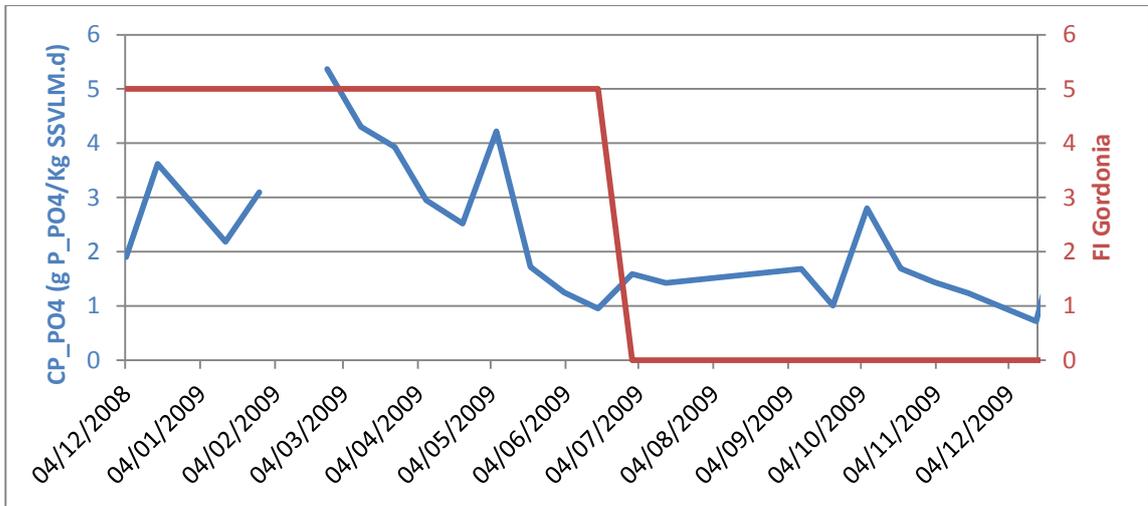


Figura 6-25 Carga de Fósforo-fosfatos (CP PO4), nivel de Gordonia. Quart-Benager.

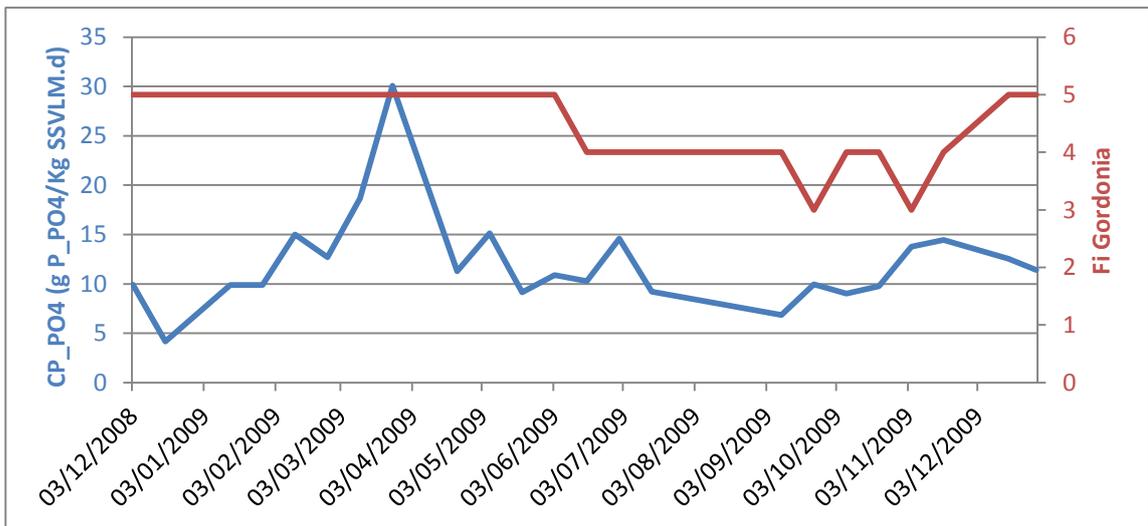


Figura 6-26 Carga de Fósforo-fosfatos (CP PO4), nivel de Gordonia. Castellón L1.

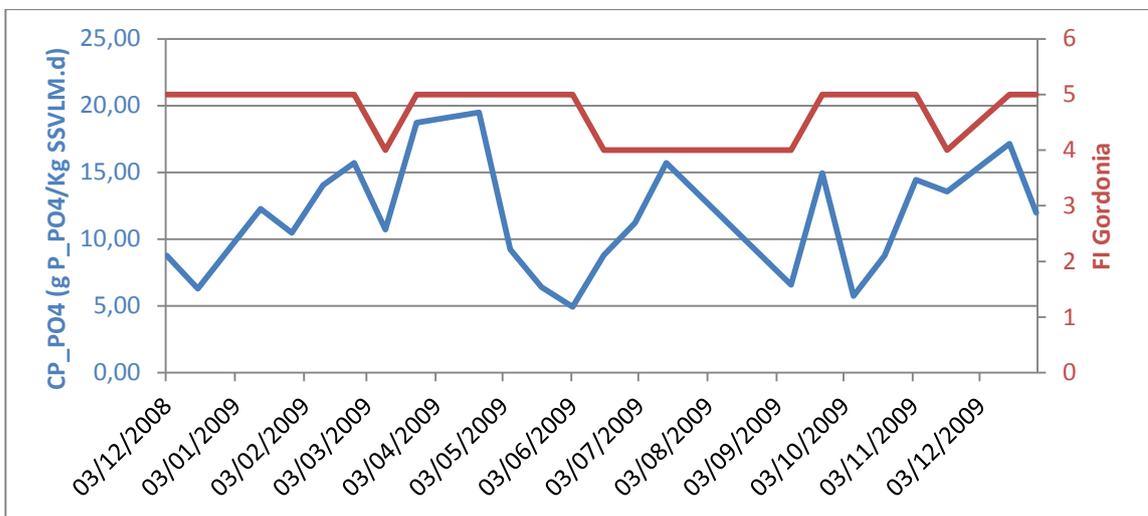


Figura 6-27 Carga de Fósforo-fosfatos (CP PO4), nivel de Gordonia. Castellón L2.

III.I.VIIICPTs frente a FI Gordonia

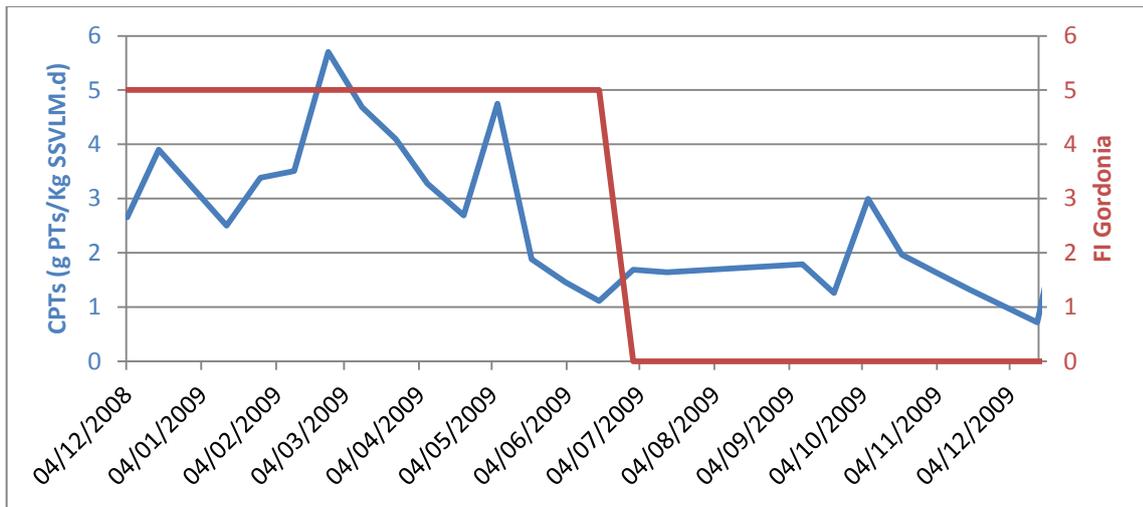


Figura 6-28 Carga de Fósforo Total soluble (CPTs), nivel de Gordonia. Quart-Benager.

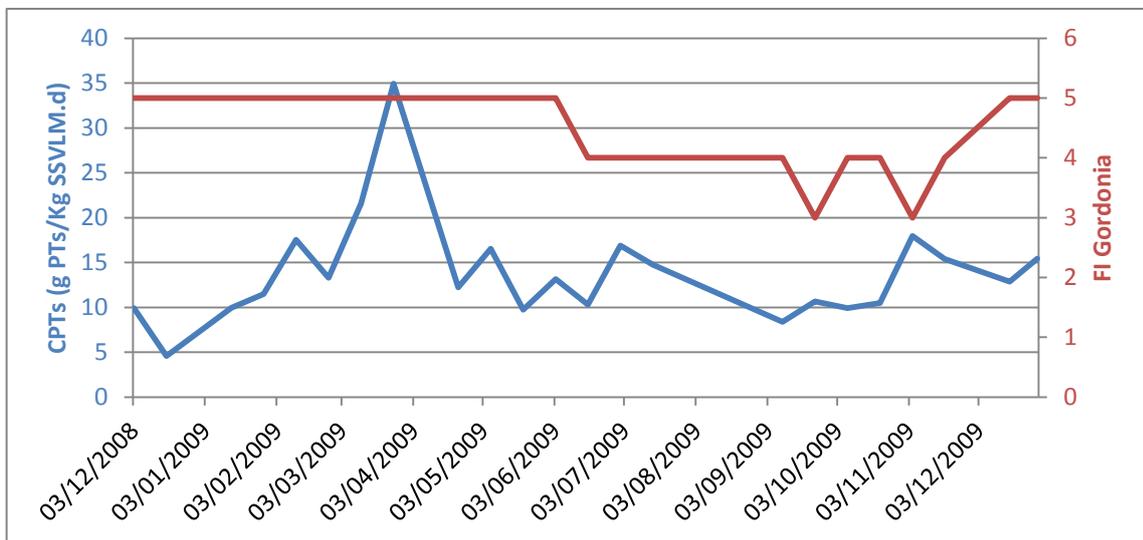


Figura 6-29 Carga de Fósforo Total soluble (CPTs), nivel de Gordonia. Castellón L1.

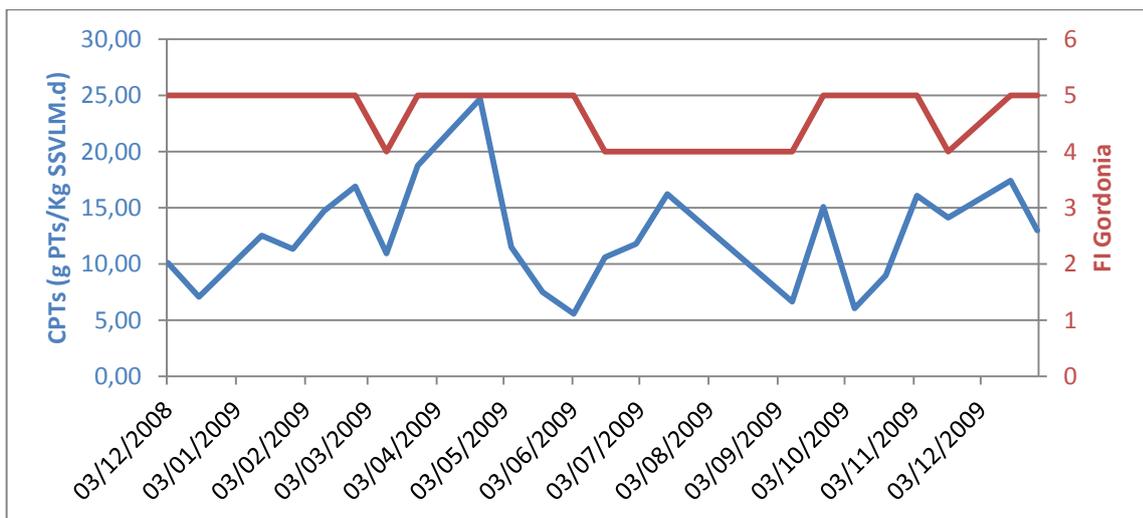


Figura 6-30 Carga de Fósforo Total soluble (CPTs), nivel de Gordonia. Castellón L2.

III.I.IX CN_NH4 frete a FI Gordonia

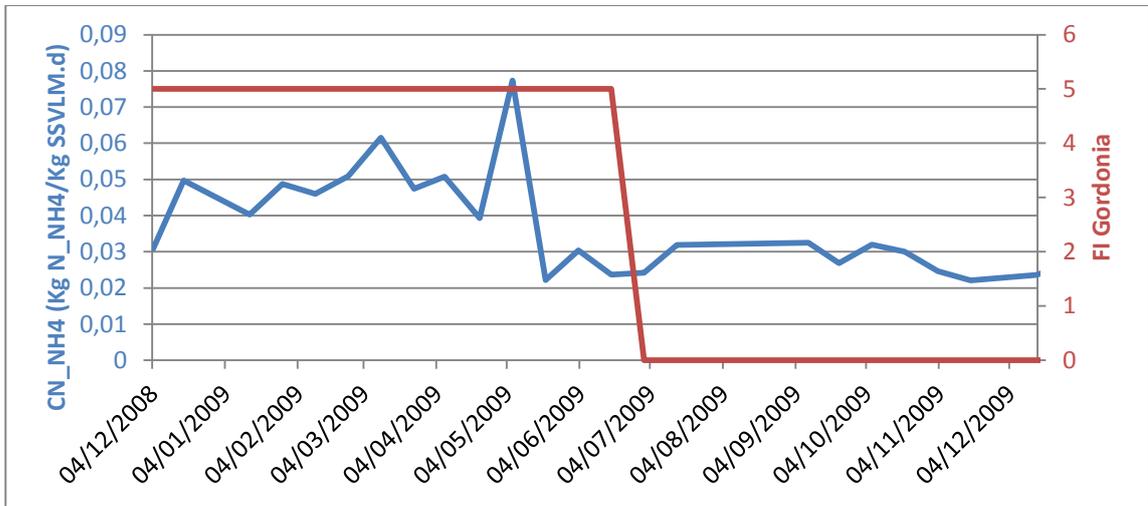


Figura 6-31 Carga de Nitrógeno amoniacal (CN NH4), nivel de Gordonia. Quart-Benager.

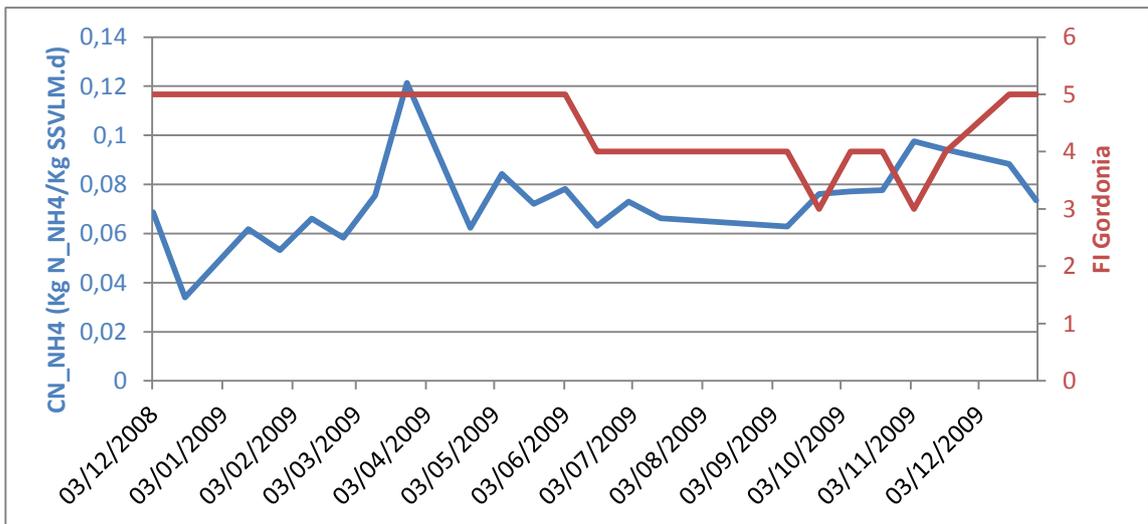


Figura 6-32 Carga de Nitrógeno amoniacal (CN NH4), nivel de Gordonia. Castellón L1.

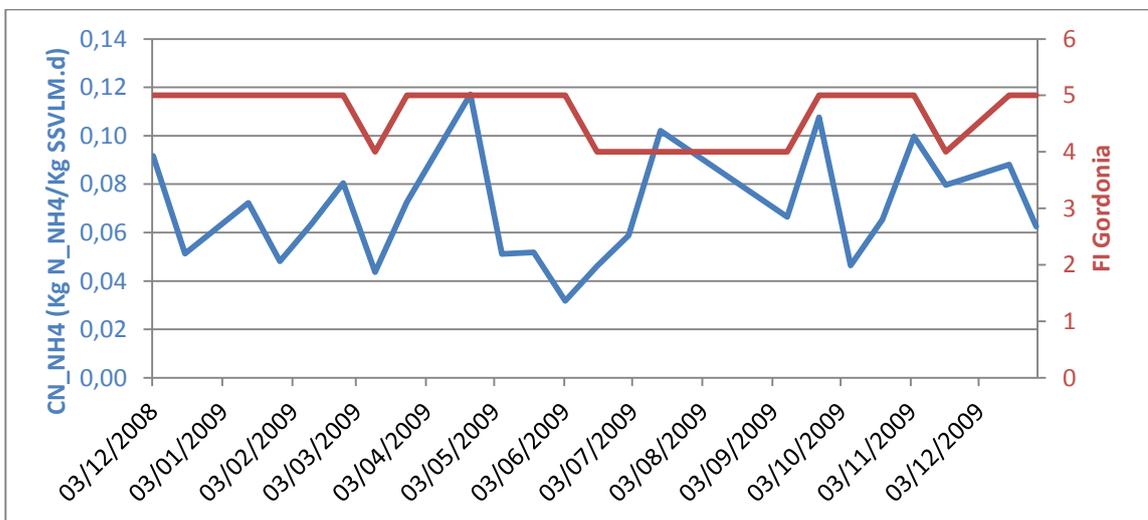


Figura 6-33 Carga de Nitrógeno amoniacal (CN NH4), nivel de Gordonia. Castellón L2.

III.I.X DBO5/NKT frente a FI Gordonia

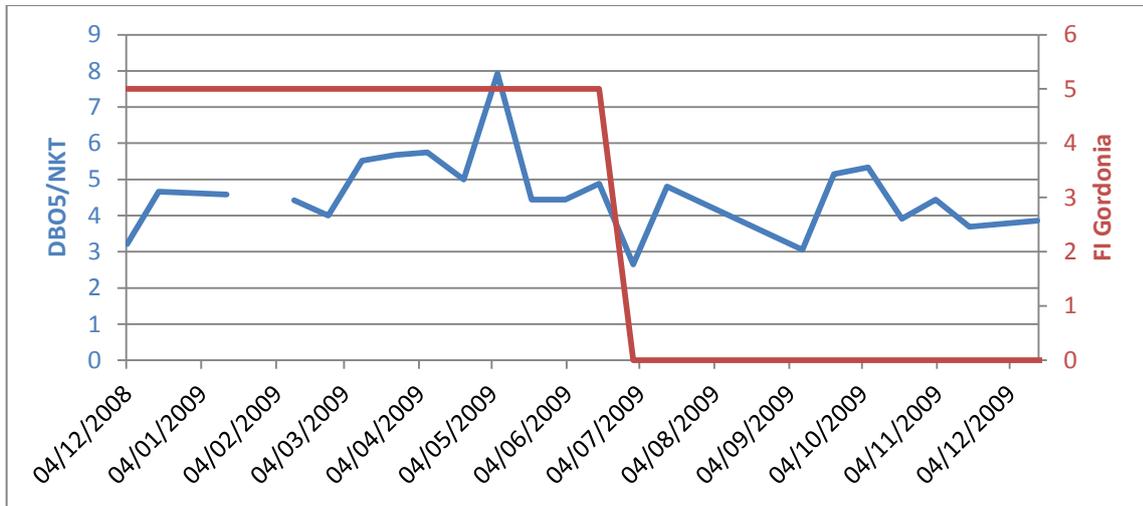


Figura 6-34 Relación DBO5/NKT, nivel de Gordonia. Quart-Benager.

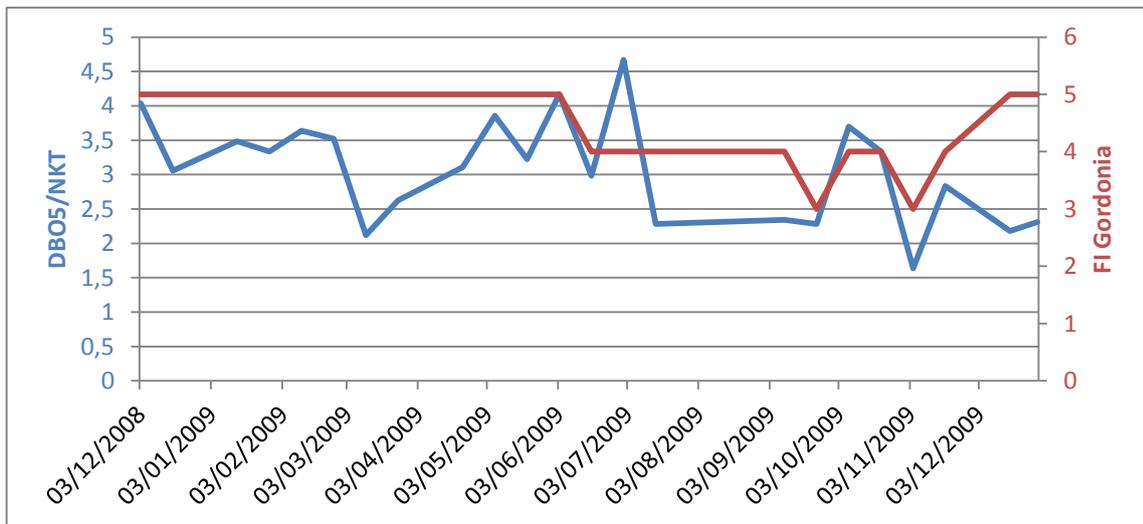


Figura 6-35 Relación DBO5/NKT, nivel de Gordonia. Castellón L1.

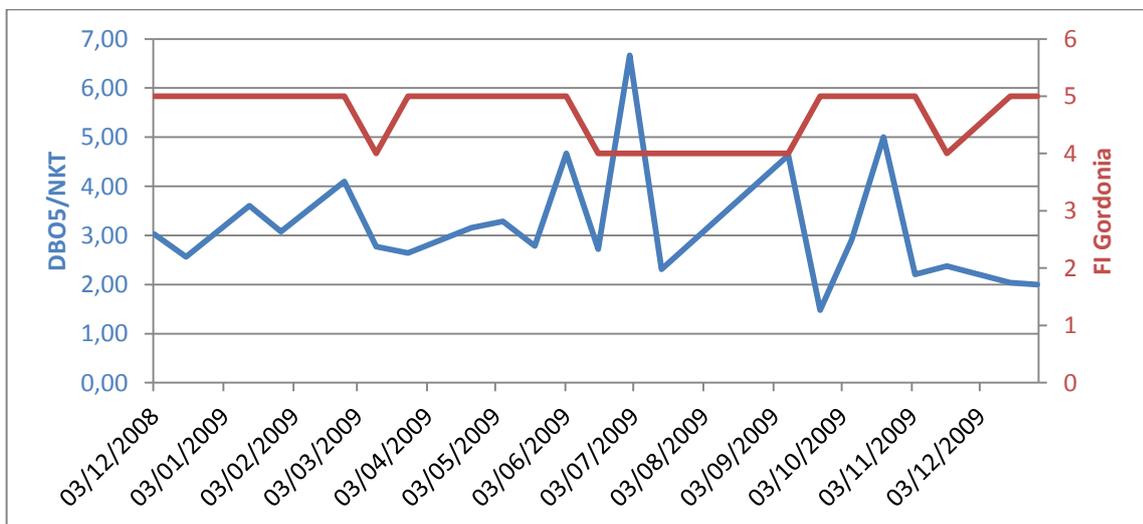


Figura 6-36 Relación DBO5/NKT, nivel de Gordonia. Castellón L2.

III.I.XI DBO/PT frente a FI Gordonia

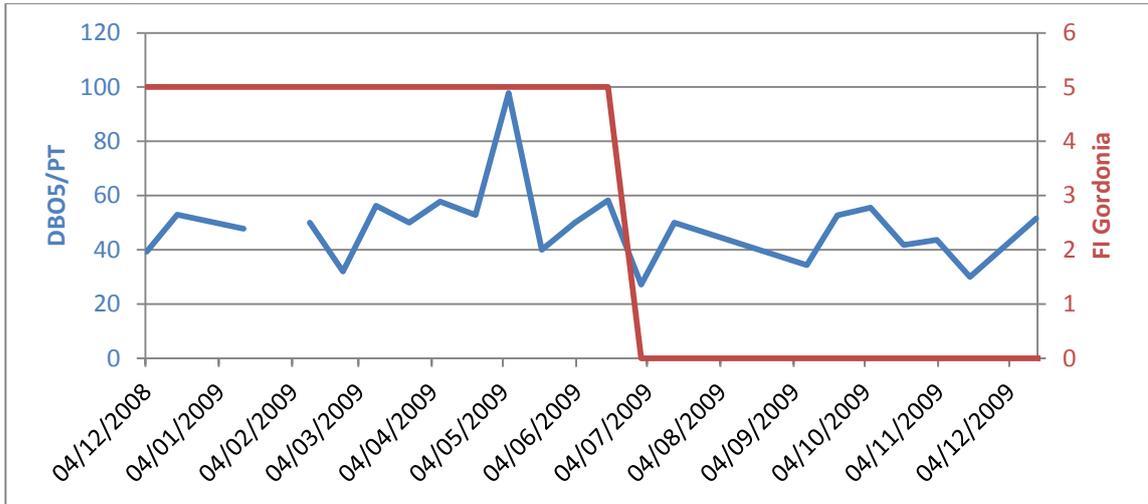


Figura 6-37 Relación DBO5/PT, nivel de Gordonia. Quart-Benager

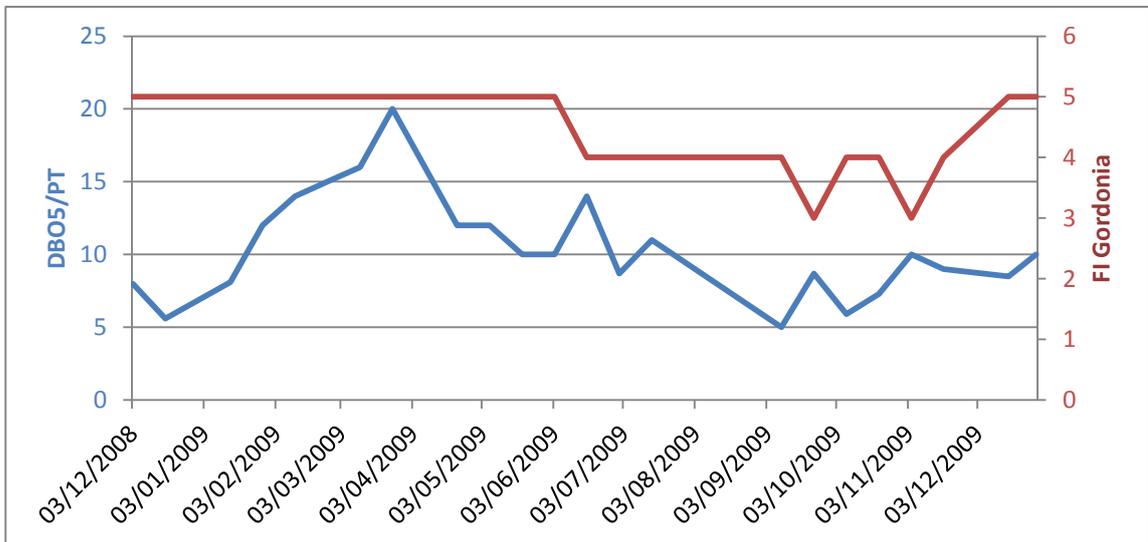


Figura 6-38 Relación DBO5/PT, nivel de Gordonia. Castellón L1.

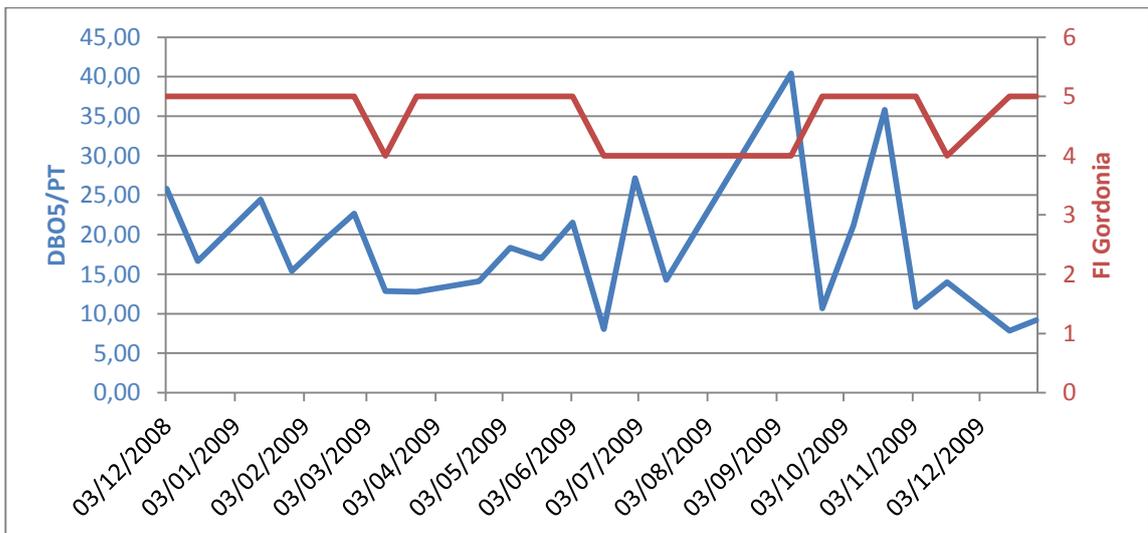


Figura 6-39 Relación DBO5/PT, nivel de Gordonia. Castellón L2.

III.II Variables Licor de Mezcla

III.II.I SSLM frente a FI Gordonia

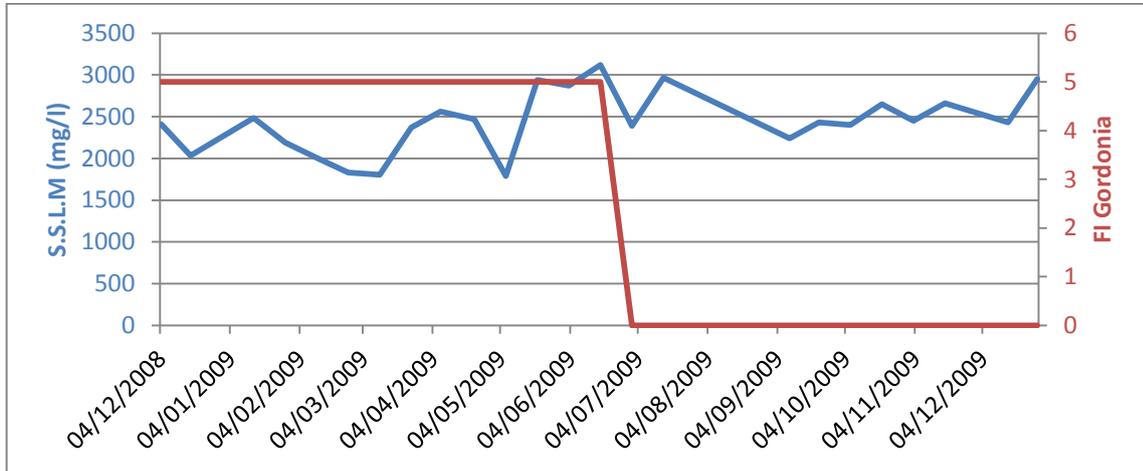


Figura 6-40 Sólidos en Suspensión Licor de Mezcla (SSLM), nivel de Gordonia. Quart-Benager.

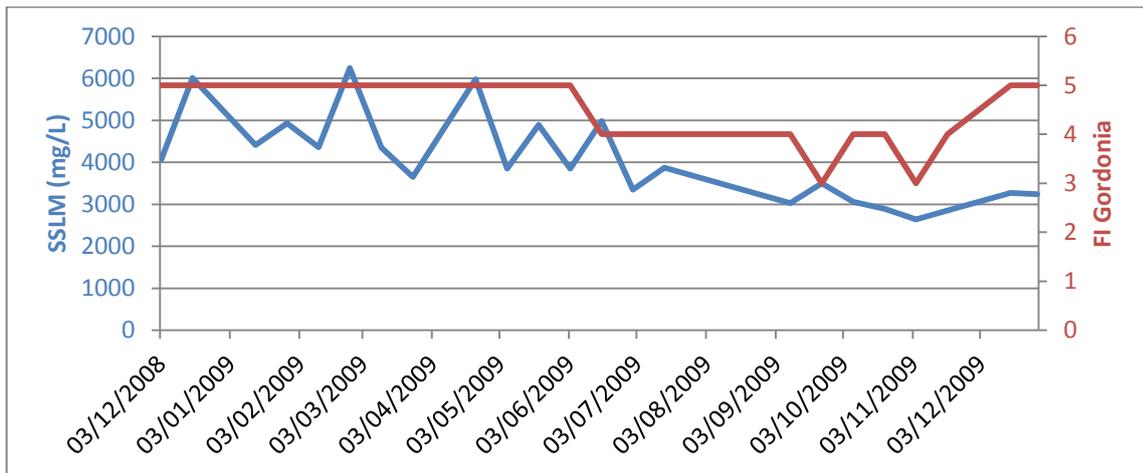


Figura 6-41 Sólidos en Suspensión Licor de Mezcla (SSLM), nivel de Gordonia. Castellón L1.

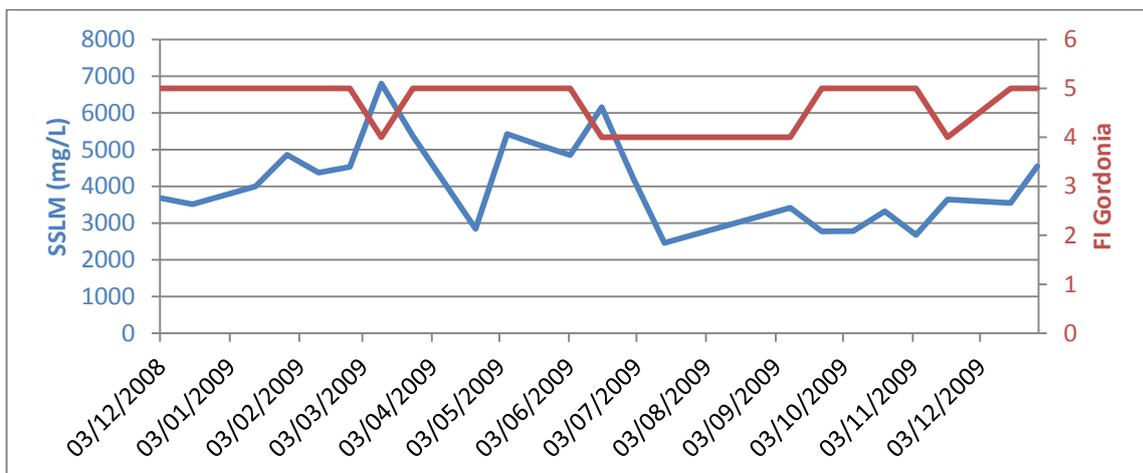


Figura 6-42 Sólidos en Suspensión Licor de Mezcla (SSLM), nivel de Gordonia. Castellón L2.

III.II.II pH frente a FI Gordonia

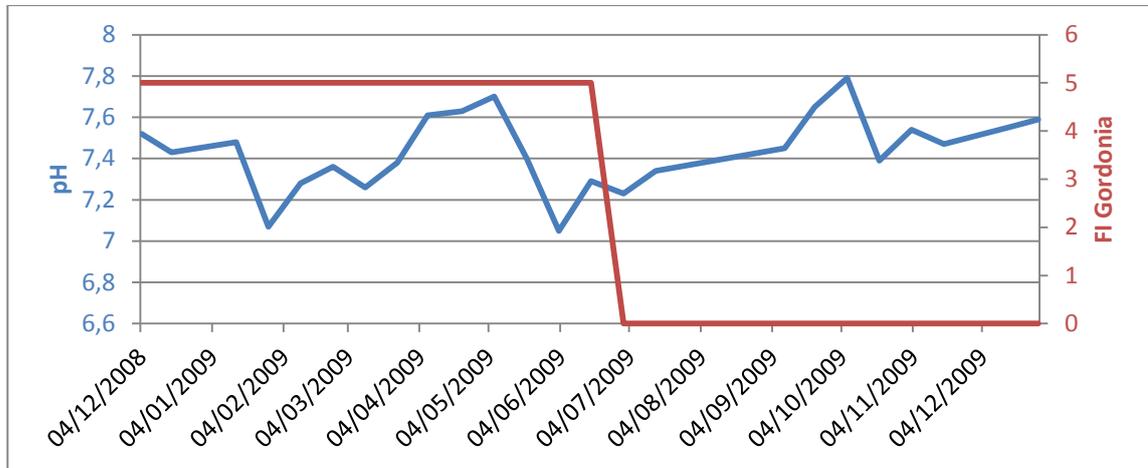


Figura 6-43 pH, nivel de Gordonia. Quart-Benager.

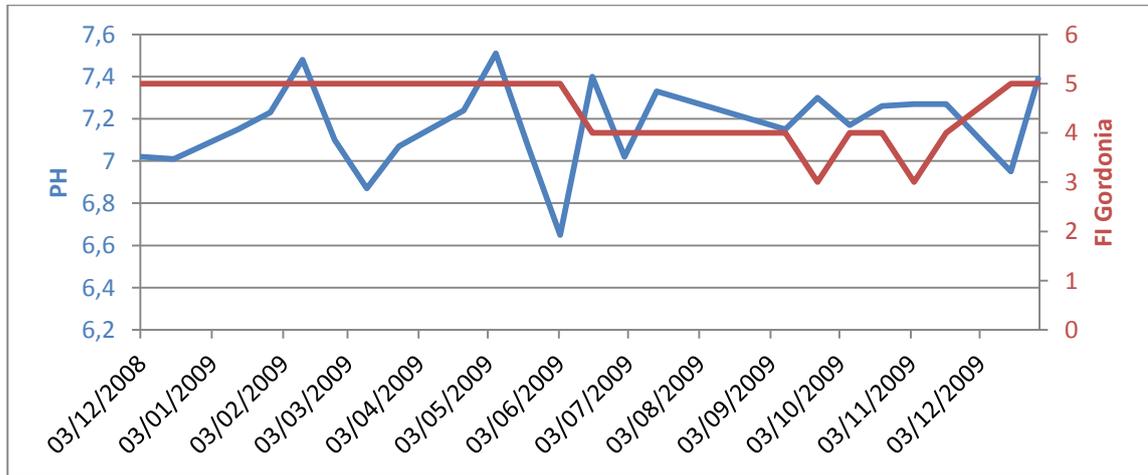


Figura 6-44 pH, nivel de Gordonia. Castellón L1.

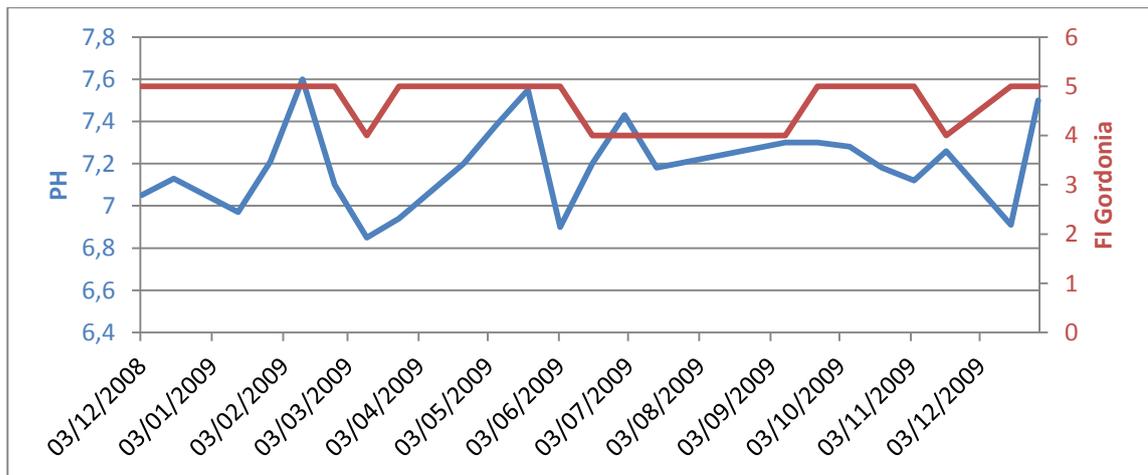


Figura 6-45 pH, nivel de Gordonia. Castellón L2.

III.II.III Conductividad frente a FI Gordonia

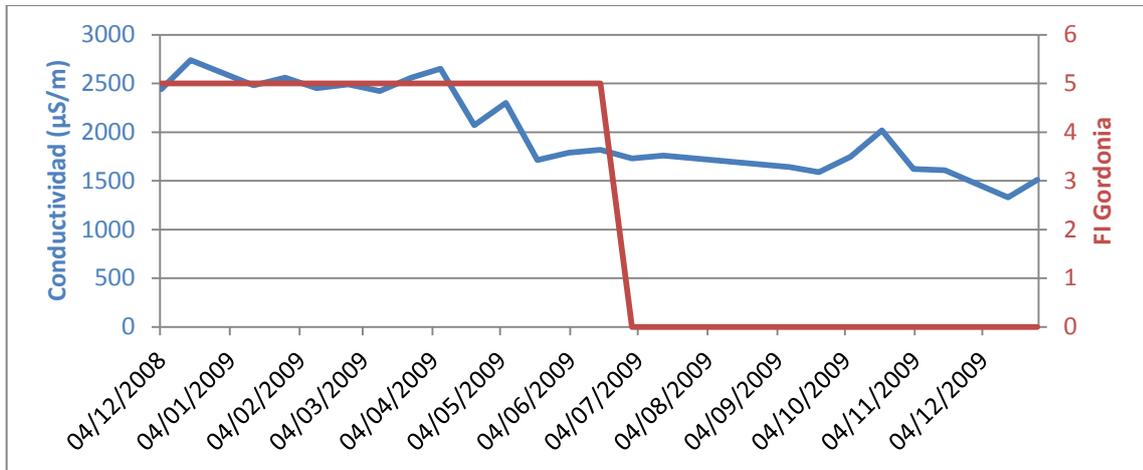


Figura 6-46 Conductividad, nivel de Gordonia. Quart-Benager.

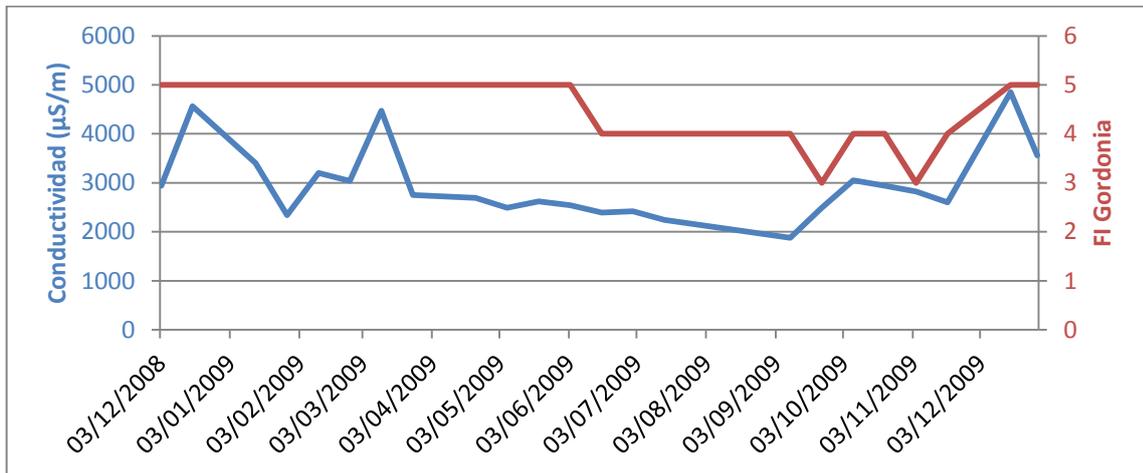


Figura 6-47 Conductividad, nivel de Gordonia. Castellón L1.

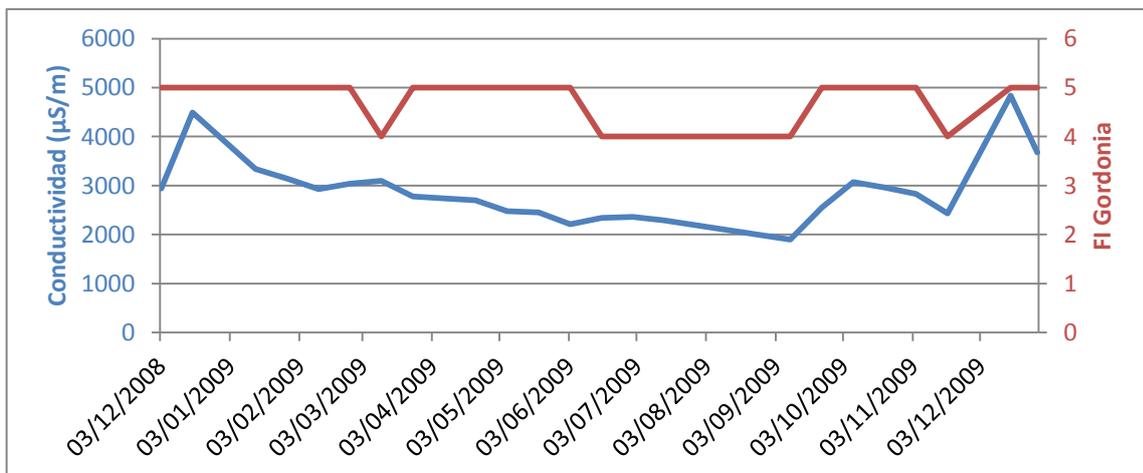


Figura 6-48 Conductividad, nivel de Gordonia. Castellón L2.

III.II.IV Temperatura frente a FI Gordonia

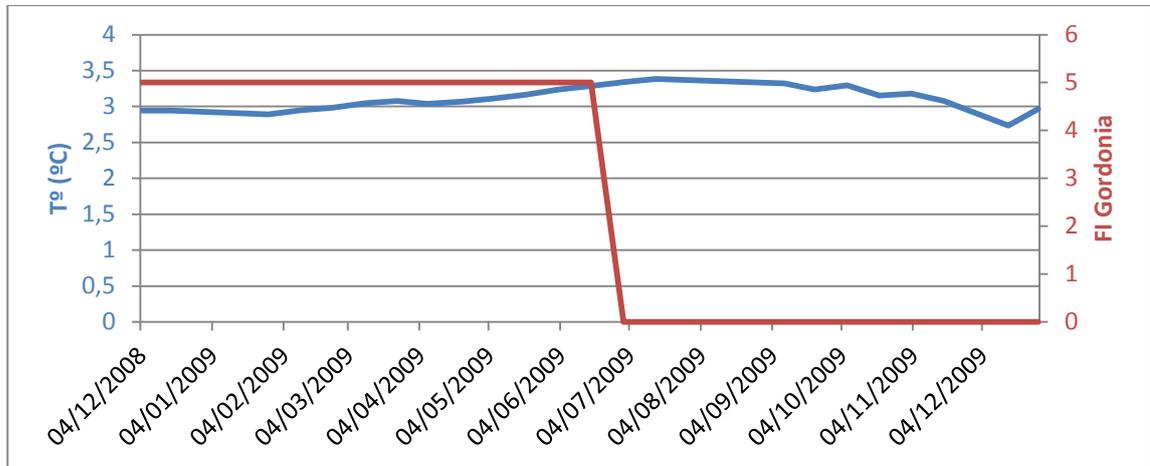


Figura 6-49 Temperatura, nivel de Gordonia. Quart-Benager.

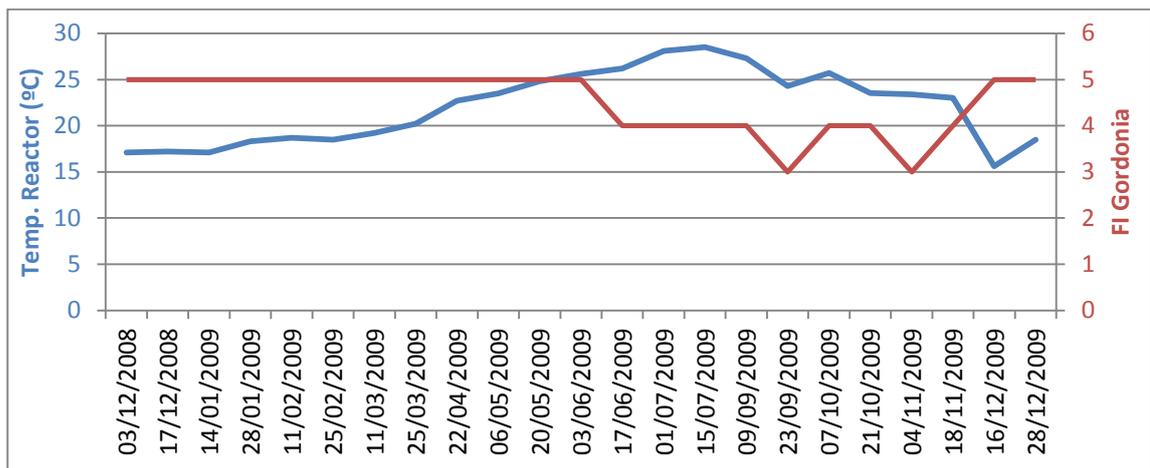


Figura 6-50 Temperatura, nivel de Gordonia. Castellón L1.

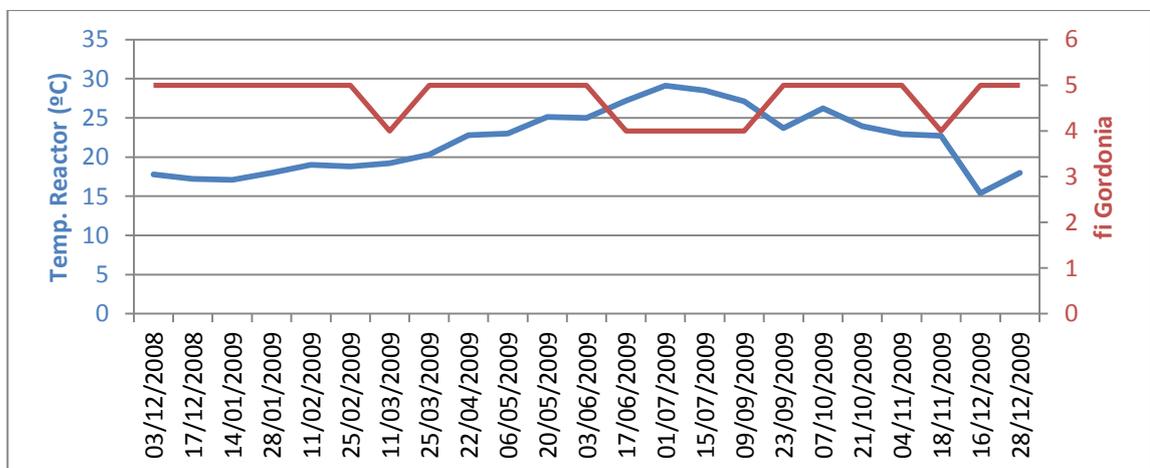


Figura 6-51 Temperatura, nivel de Gordonia. Castellón L2.

III.III Variables operacionales

III.III.I Oxígeno bajo frente a FI Gordonia

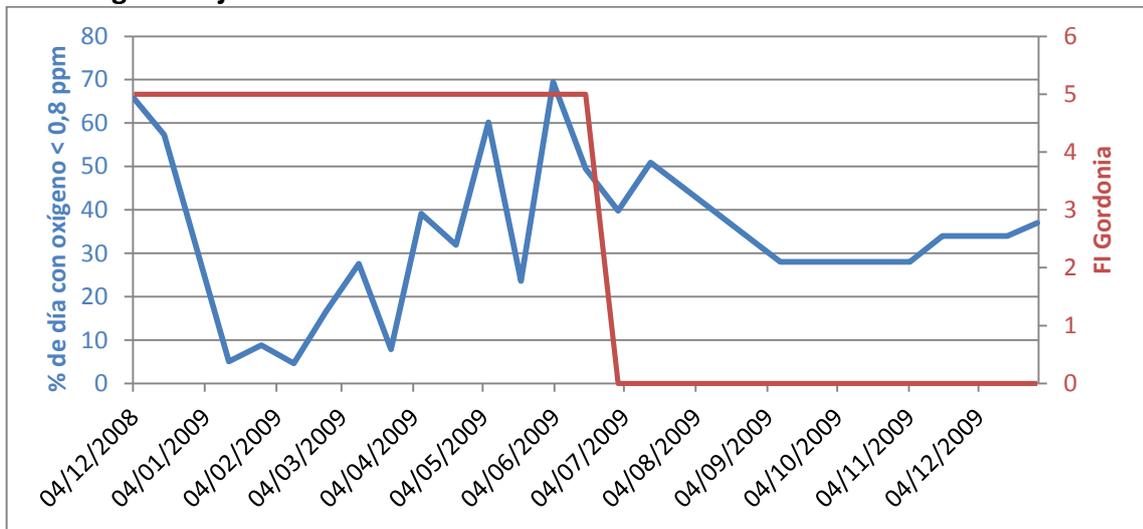


Figura 6-52 Oxígeno bajo, nivel de Gordonia. Quart-Benager.

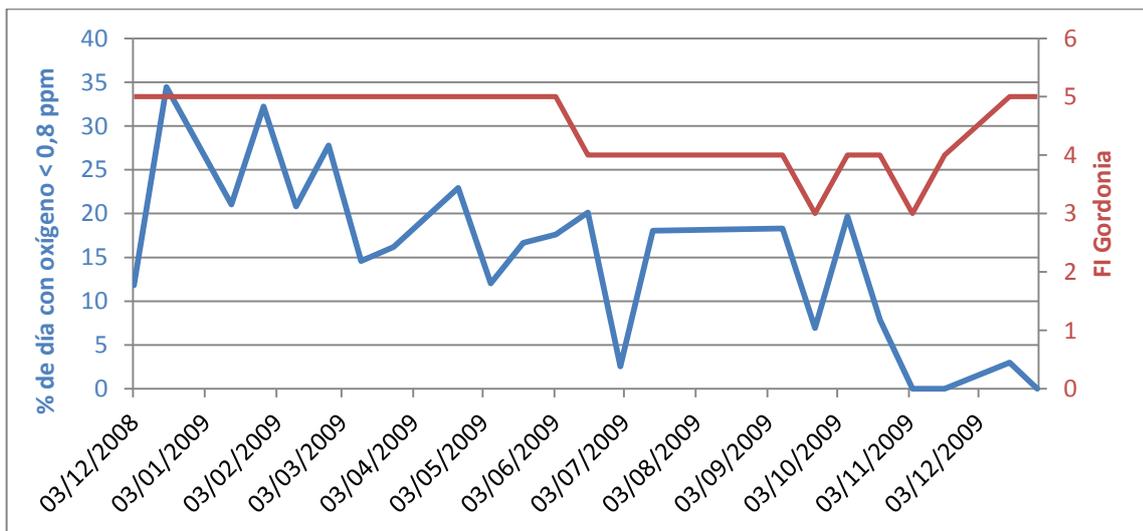


Figura 6-53 Oxígeno bajo, nivel de Gordonia. Castellón L1.

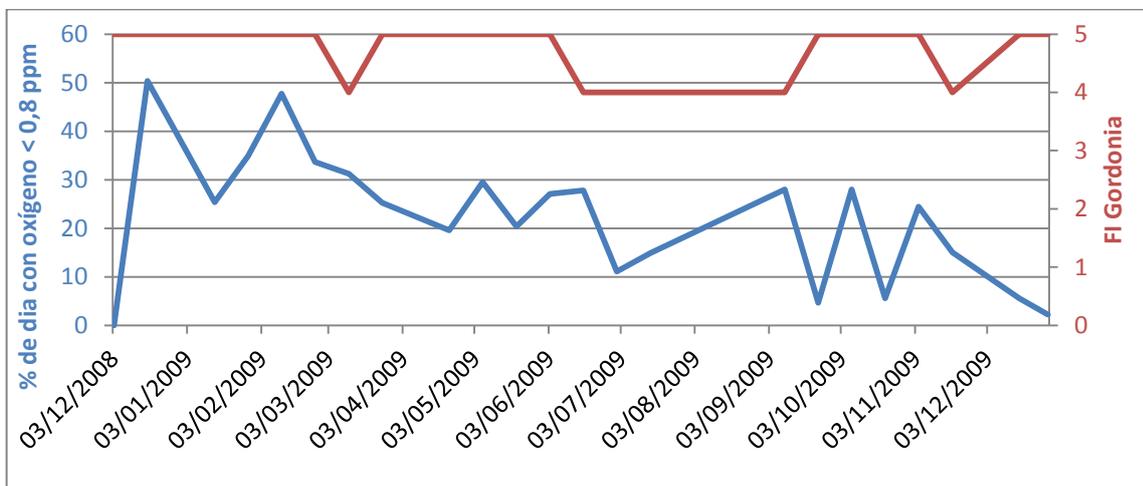


Figura 6-54 Oxígeno bajo, nivel de Gordonia. Castellón L2.

III.III.II Oxígeno medio frente a FI Gordonia

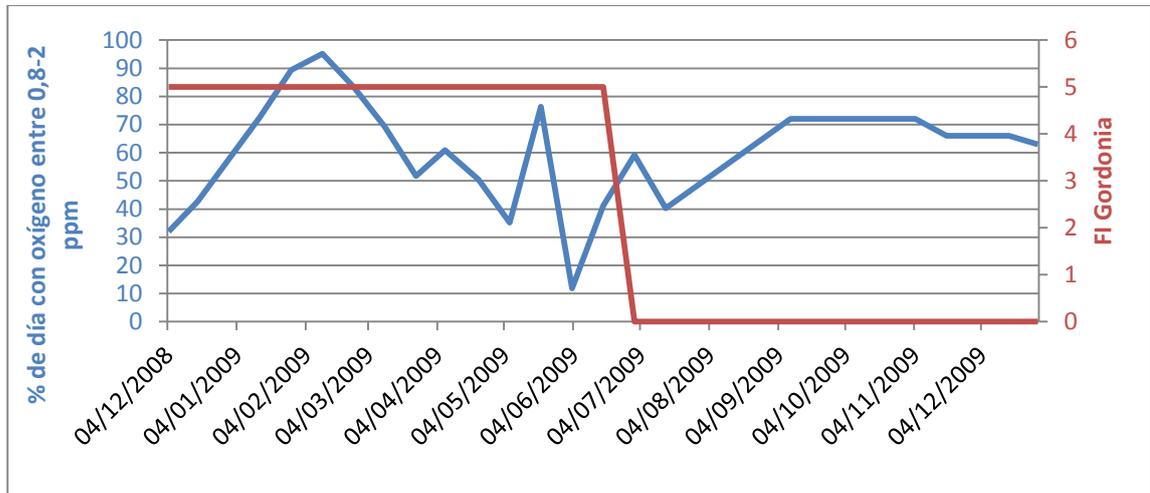


Figura 6-55 Oxígeno medio, nivel de Gordonia. Quart-Benager.

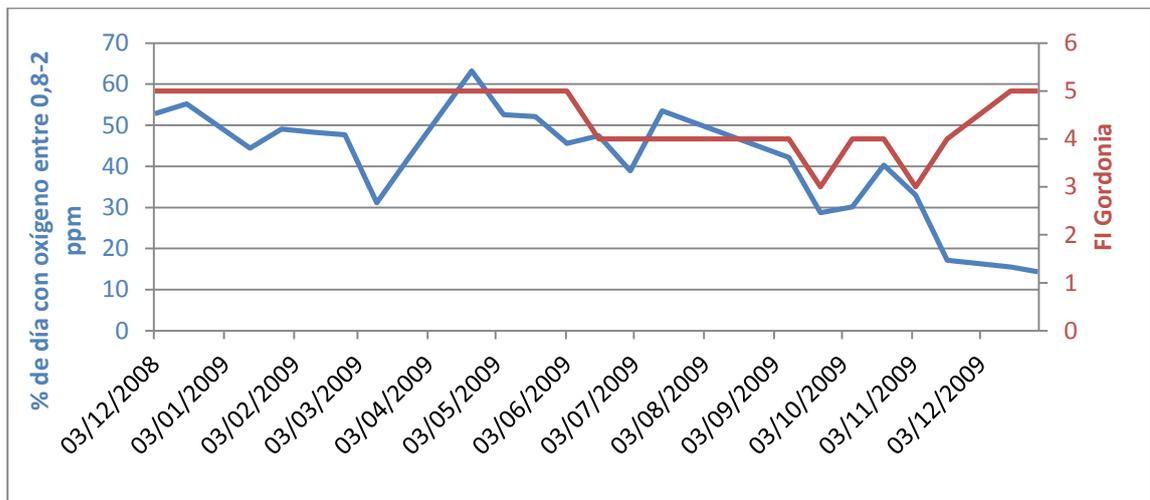


Figura 6-56 Oxígeno medio, nivel de Gordonia. Castellón L1.

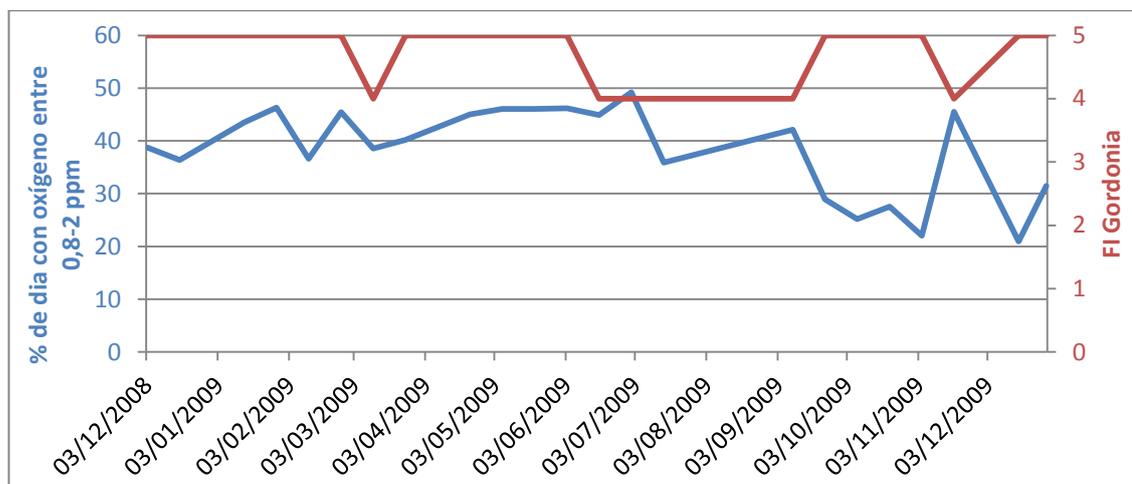


Figura 6-57 Oxígeno medio, nivel de Gordonia. Castellón L2.

III.III.III Oxígeno alto frente a FI Gordonia

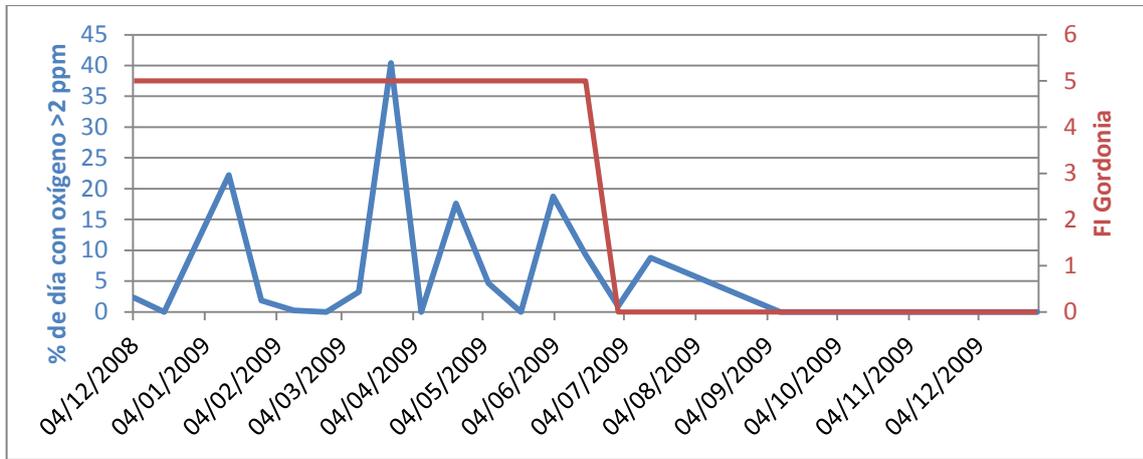


Figura 6-58 Oxígeno alto, nivel de Gordonia. Quart-Benager.

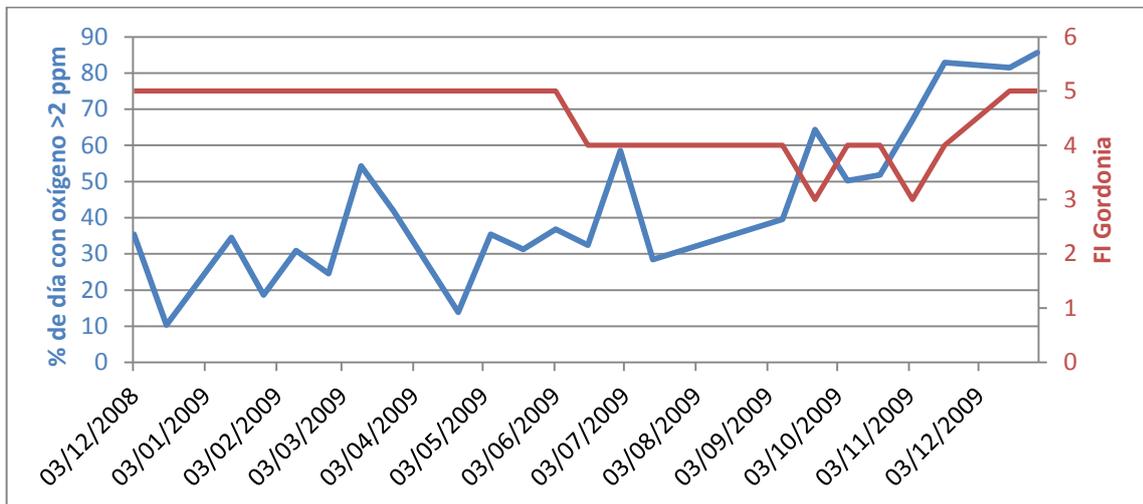


Figura 6-59 Oxígeno alto, nivel de Gordonia. Castellón L1.

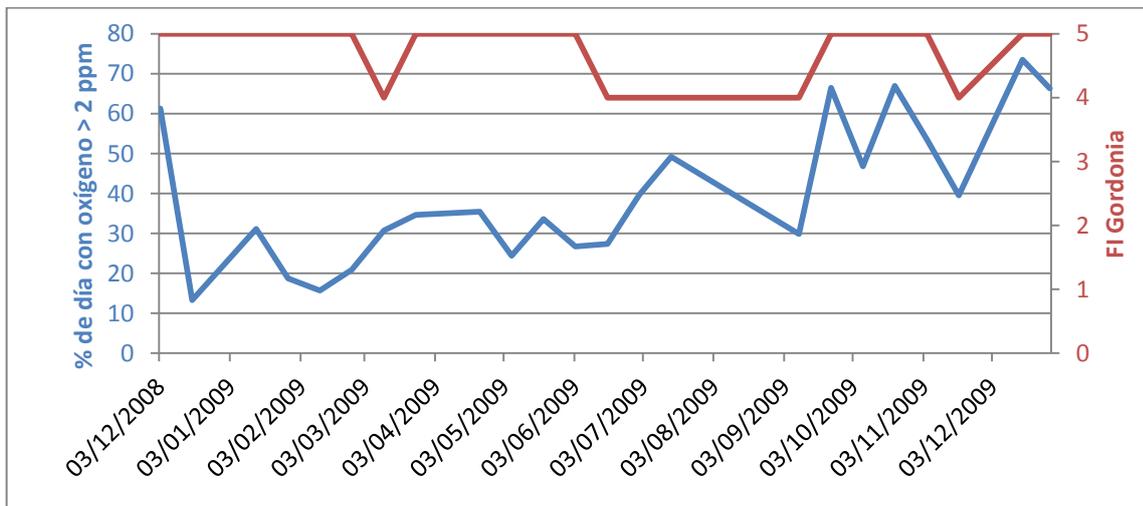


Figura 6-60 Oxígeno alto, nivel de Gordonia. Castellón L2.

III.III.IVOxígeno promedio en ppm frente a FI Gordonia

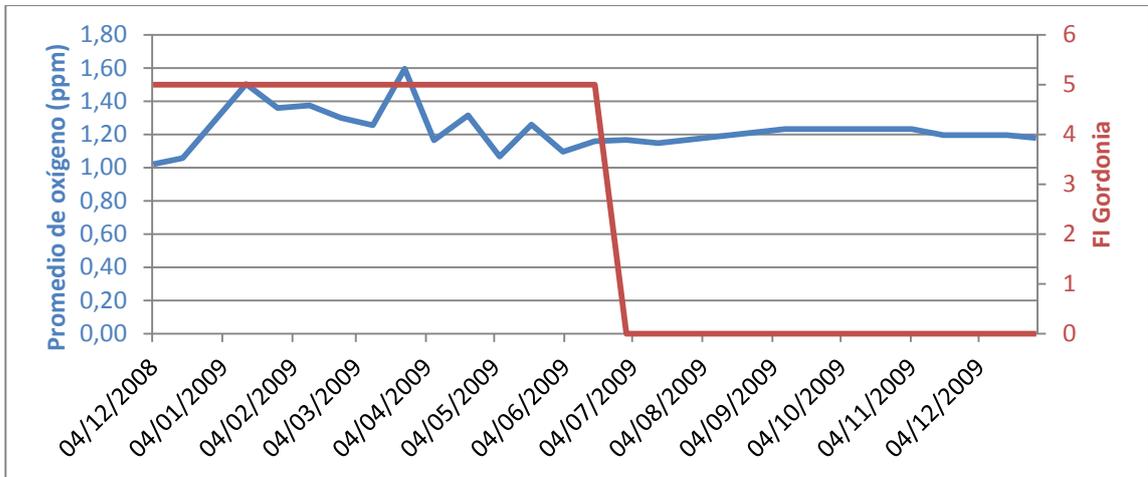


Figura 6-61 Promedio de Oxígeno (ppm), nivel de Gordonia. Quart-Benager.

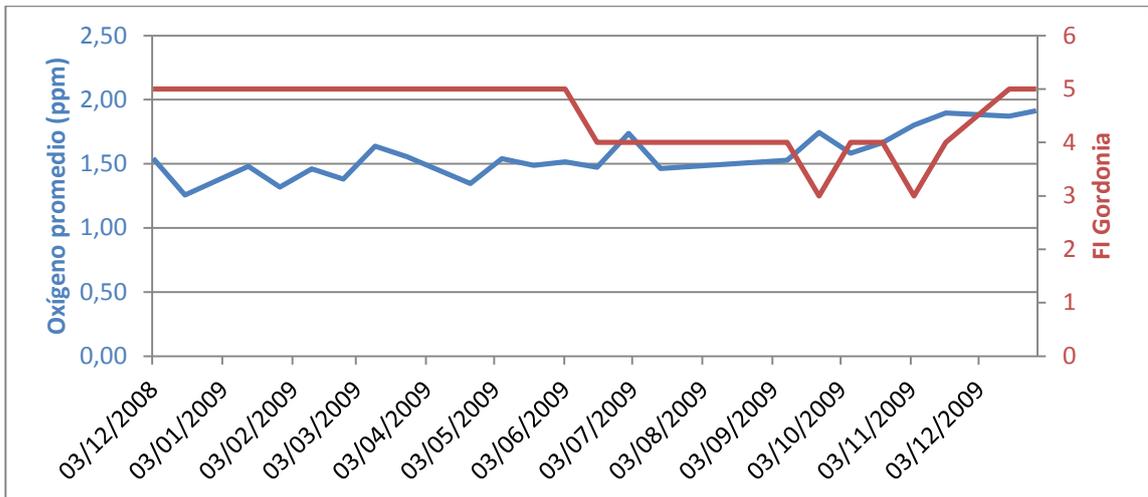


Figura 6-62 Promedio de Oxígeno (ppm), nivel de Gordonia. Castellón L1.

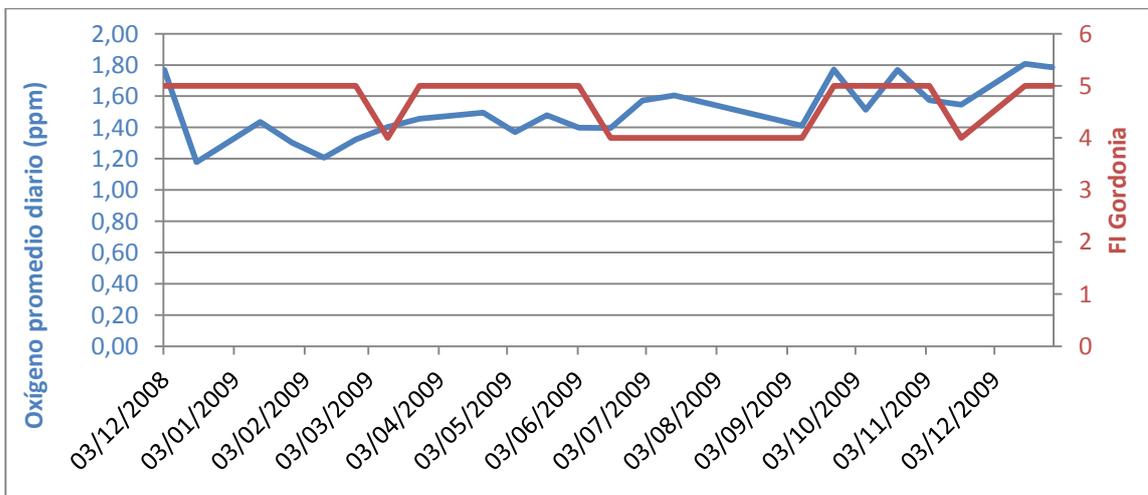


Figura 6-63 Promedio de Oxígeno (ppm), nivel de Gordonia. Castellón L2.

III.III.V Tiempo de retención hidráulico frente a FI Gordonia

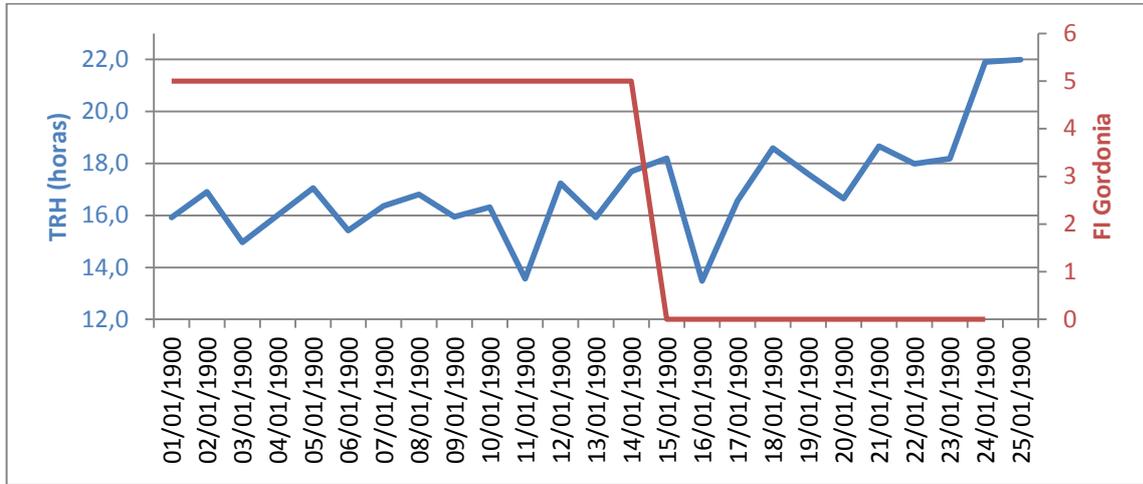


Figura 6-64 Tiempo de Retención Hidráulico (TRH), nivel de Gordonia. Quart-Benager.

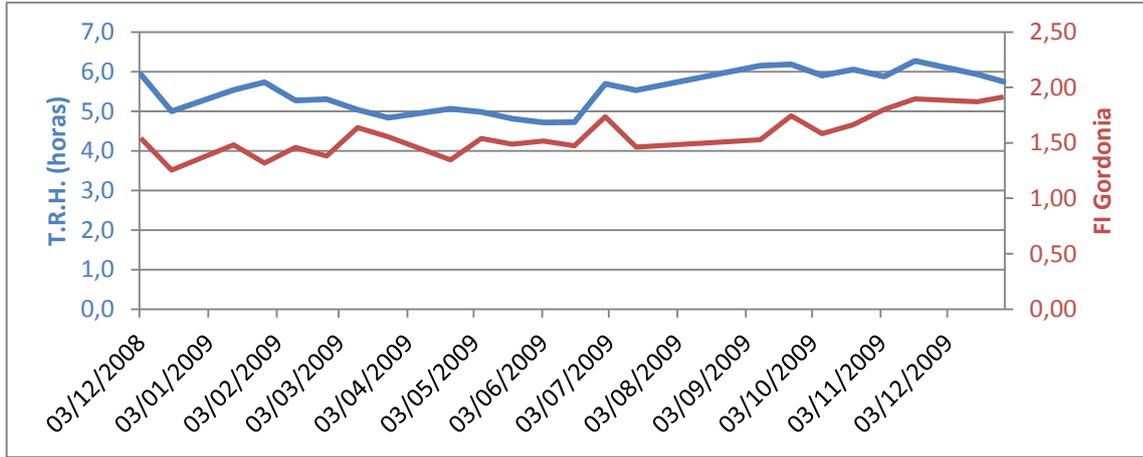


Figura 6-65 Tiempo de Retención Hidráulico (TRH), nivel de Gordonia. Castellón L1.

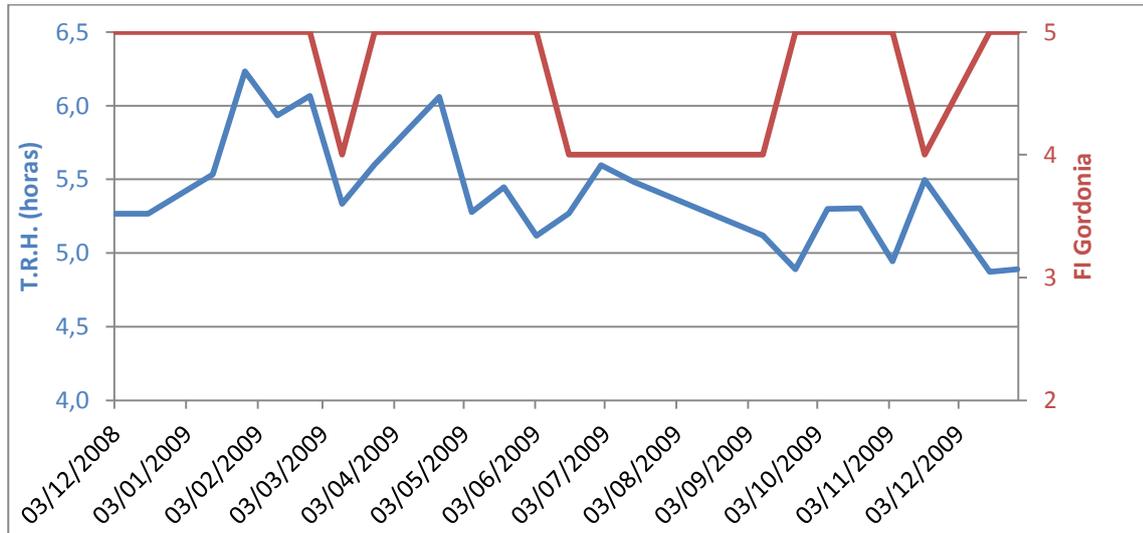


Figura 6-66 Tiempo de Retención Hidráulico (TRH), nivel de Gordonia. Castellón L2.

III.III.VI Edad de fango frente a FI Gordonia

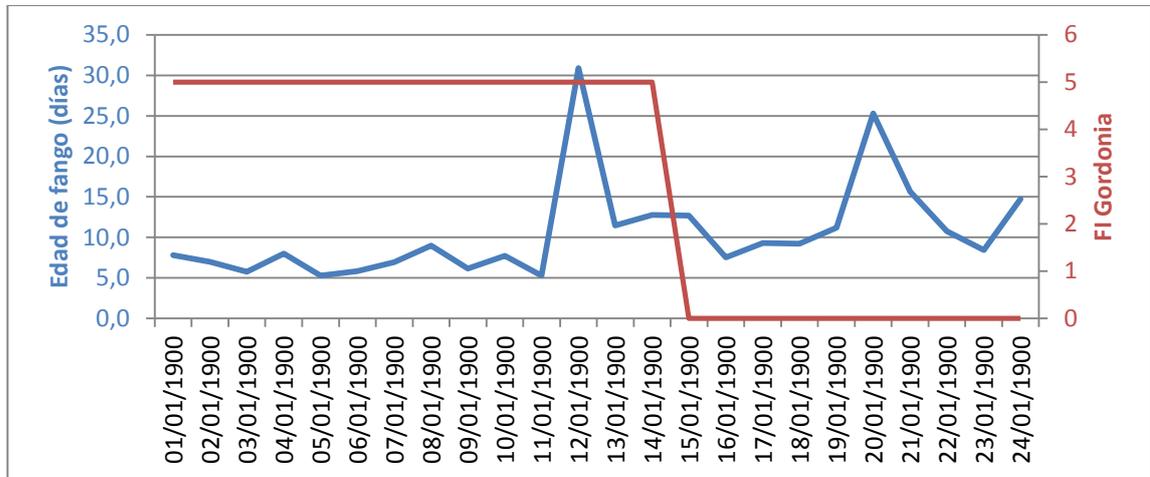


Figura 6-67 Edad de Fango (EF), nivel de Gordonia. Quart-Benager.

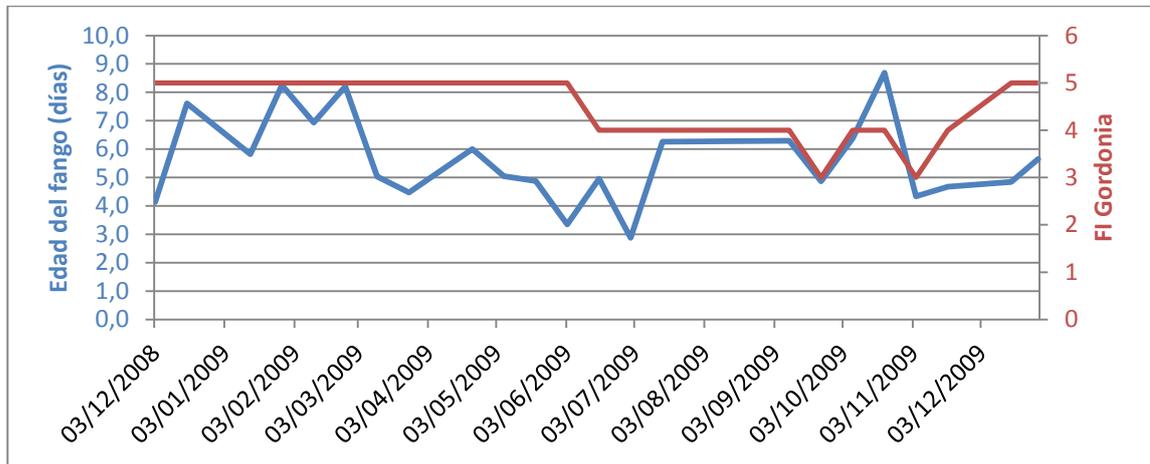


Figura 6-68 Edad de Fango (EF), nivel de Gordonia. Castellón L1.

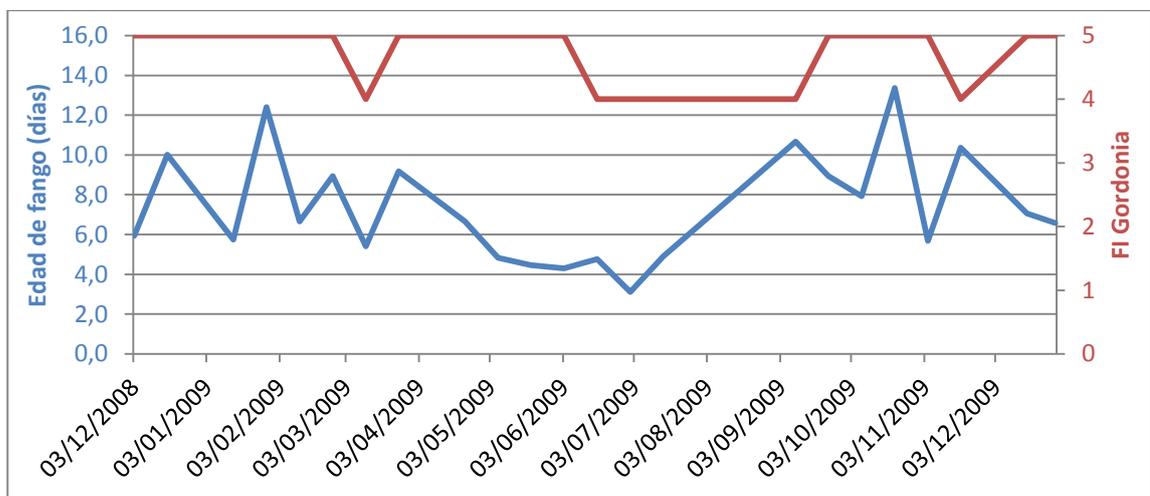


Figura 6-69 Edad de Fango (EF), nivel de Gordonia. Castellón L2.

III.III.VII Carga másica

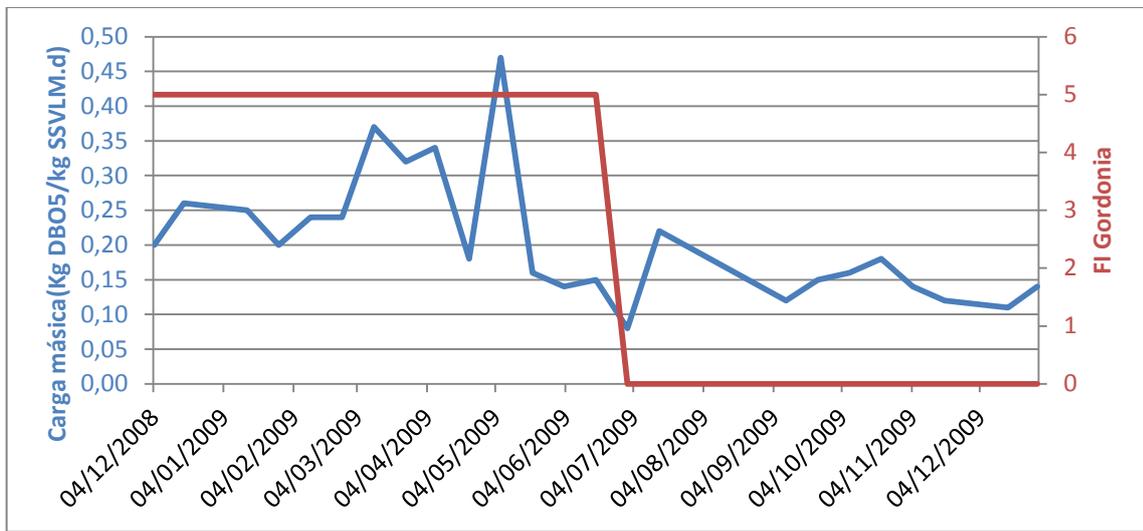


Figura 6-70 Carga Másica (CM), nivel de Gordonia. Quart-Benager.

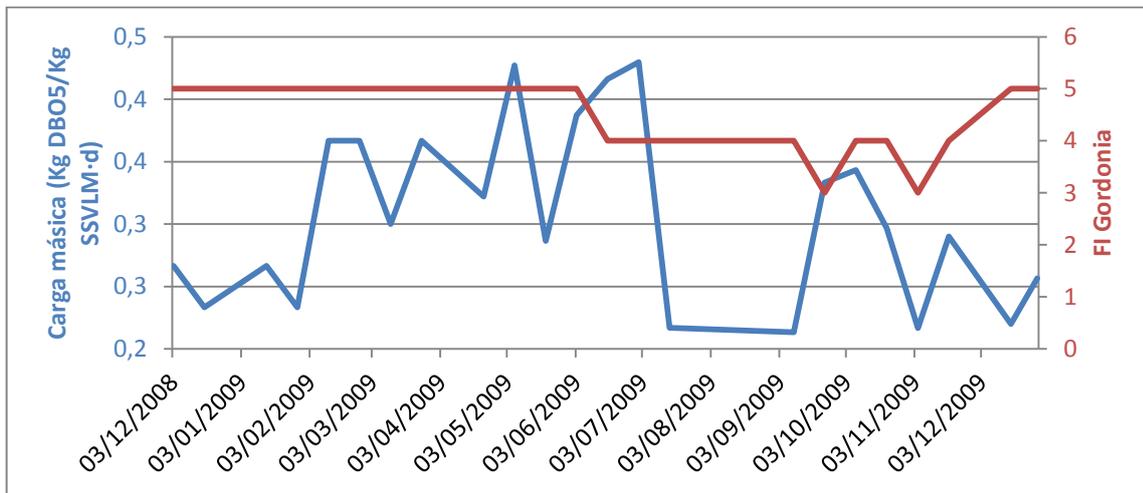


Figura 6-71 Carga Másica (CM), nivel de Gordonia. Castellón L1.

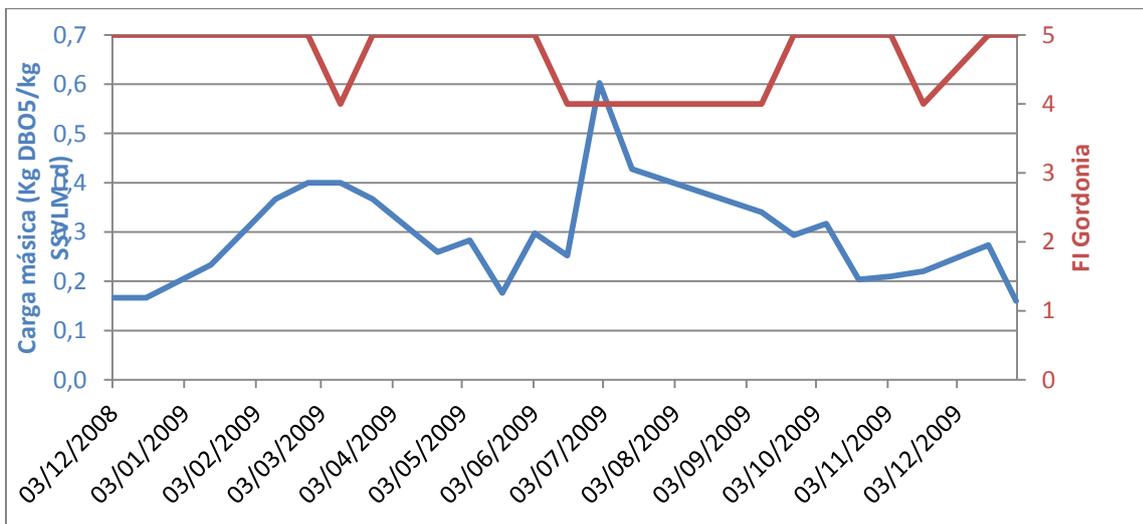


Figura 6-72 Carga Másica (CM), nivel de Gordonia. Castellón L2.