

ESTUDIO DE LA DINÁMICA POBLACIONAL DE PROTISTAS, METAZOOS Y BACTERIAS FILAMENTOSAS Y SU INTERPRETACIÓN ECOLÓGICA EN FANGOS ACTIVOS

TESIS DOCTORAL
Andrés M. Zornoza Zornoza

Estudio de la dinámica poblacional de protistas, metazoos y bacterias filamentosas y su interpretación ecológica en fangos activos

TESIS DOCTORAL
Andrés M. Zornoza Zornoza

Valencia, enero de 2017
Departamento de Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente



Directores
Dr. José Luis Alonso Molina
Dra. Susana Serrano Barrero

"...que este trabajo sirva para avanzar en el conocimiento...y aporte herramientas útiles para la monitorización del proceso biológico..."

0.2

0

-0.2

-0.4

-0.6

-0.5

0

0.5

Universitat Politècnica de València

Departamento de Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente

Tesis Doctoral



Estudio de la dinámica poblacional de protistas, metazoos y bacterias filamentosas y su interpretación ecológica en fangos activos

Memoria presentada por Andrés M. Zornoza Zornoza para optar al grado de Doctor por la Universitat Politècnica de València

Directores

Dr. José Luis Alonso Molina

Dra. Susana Serrano Barrero

Valencia, Enero de 2017

© Andrés M. Zornoza Zornoza, 2016

Primera edición, 2017

© de la presente edición:

Editorial Universitat Politècnica de València

www.editorial.upv.es

Queda prohibida la reproducción, distribución, comercialización, transformación, y en general, cualquier otra forma de explotación, por cualquier procedimiento, de todo o parte de los contenidos de esta obra sin autorización expresa y por escrito de sus autores.

"...no debe sentir sorpresa nadie por lo mucho que queda todavía sin explicar respecto al origen de las especies y de las variedades, si se tiene en cuenta nuestra profunda ignorancia respecto a las relaciones mutuas de los muchos seres que viven en nuestro alrededor. ¿Quién puede explicar por qué una especie se extiende mucho y es muy numerosa, y por qué otra especie afín tiene una dispersión reducida y es rara?..."

Charles Darwin (1859)

PRÓLOGO

Todo comenzó en diciembre de 1999, cuando la abundante vida microscópica de una simple gota de fango activo me lanzó al atrevimiento de acercarme a intentar entender aquel desconocido, para mí, ecosistema. Me sorprendía enormemente vislumbrar en el reactor biológico como en tan poco tiempo algunas especies eran tan numerosas, para después pasar casi desapercibidas. Fue en el laboratorio de mi estimada EDAR Quart-Benàger donde cultivé muchos de mis conocimientos, de una forma autodidacta, empujado por mi inquietud a lo desconocido, y donde fotografié y clasifiqué microorganismos del fango activo, intentando buscar explicación a su presencia.

No tardé mucho en encontrar profesionales con las mismas inquietudes, como los que integraban el Grupo Bioindicación de Sevilla (GBS). Mi colaboración con GBS me permitió caminar acompañado defendiendo unas técnicas de bioindicación, que por aquel entonces no tenían su merecida aceptación. Asumimos por tanto el difícil cometido de acercarnos a los profesionales de las instalaciones de tratamiento de aguas residuales para transferir la tecnología y los conocimientos en bioindicación y control del proceso biológico, continuando el camino que nos habían dejado las excelentes aportaciones científicas publicadas por investigadores españoles durante la década de los noventa. Este fue sin duda el principio de un periodo del que guardo inolvidables momentos, fruto de mucho esfuerzo y trabajo, en la bonita ciudad de Sevilla.

Durante once años ofrecí mis servicios en la EDAR Quart-Benàger, donde el paso de dos empresas de explotación me permitió documentar innumerables episodios caracterizados por problemas biológicos en las instalaciones. Por aquel entonces mi virtud era la identificación de microorganismos, mientras que comprender por qué una especie era abundante y se extendía mucho y otras eran escasas quedaba todavía algo lejano para mí. Como buen tauro, paciente y constante, me embarqué pronto a colaborar con grupos y universidades en la investigación y transferencia de tecnología, conociendo grandes técnicos e investigadores de los que he podido aprender sus mejores virtudes.

El giro más importante en mi trayectoria profesional fue sin duda el día que el Dr. José Luis Alonso me propuso la idea de presentar un proyecto conjunto a la Entidad Pública de Saneamiento de Aguas Residuales de la Comunidad Valenciana, y que “bautizamos” como: *Estudio Integrado del Proceso Biológico en Plantas de Tratamiento por Fangos Activos*. Este proyecto me sirvió para plantear las ideas e inquietudes que rondaban en mi cabeza, fruto de mis andaduras en los años anteriores. Finalmente, el proyecto fue concedido y financiado en el año 2008, convirtiéndose en la fase experimental de mi tesis doctoral, dirigida por los Doctores José Luis Alonso y Susana Serrano. Durante el 2009 consagré todo mi tiempo al seguimiento de las poblaciones de protistas, metazoos y bacterias filamentosas, así como a la toma de datos de un sinfín de variables fisicoquímicas y operacionales de cuatro EDAR. Una vez finalizada la fase experimental me surgió un gran dilema: ¿qué hacer con tal cantidad de datos?. Tenía dos alternativas: el camino sencillo, procesar los datos desde un punto de vista descriptivo y empleando análisis exploratorios, o tomar el camino difícil, el de la ordenación a partir de la

ecología numérica. Después de tanto esfuerzo y dedicación no iba a permitir que los objetivos planteados se diluyeran, y opté finalmente por la segunda opción. Este campo era totalmente desconocido para mí, por lo que tuve que empezar desde “cero” y avanzar de forma autodidacta, tal cual lo hice en el campo de la bioindicación. Para profundizar en este aprendizaje necesite un paréntesis de un año del periodo de tesis doctoral, pero al final la ecología numérica ha resultado ser un campo que me apasiona enormemente, si bien es cierto que todavía me queda mucho por explorar. Todo este minucioso estudio ha conseguido dar un sentido crítico a los datos, dando respuesta a muchas preguntas y dejando nuevos caminos para explorar.

Con esta tesis he intentado dar una orientación alternativa a la bioindicación en fangos activos, siendo sin duda toda una satisfacción personal. Espero que todo este trabajo sirva para avanzar en el conocimiento de la dinámica poblacional de protistas, metazoos y bacterias filamentosas en fangos activos, y aporte herramientas útiles para la monitorización del proceso biológico de las estaciones depuradoras de aguas residuales.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero decir que nunca hubiera escrito esta tesis doctoral sin el esfuerzo y la dedicación constante de mis padres, Ana y Miguel, para que pudiera llegar a alcanzar esta gran meta. Siempre han estado ahí cuando los he necesitado y siempre les estaré agradecidos. Tampoco pueden faltar mi hermana Ana y mi cuñado Rubén, porque sé que se sienten orgullosos de mí y les hace mucha ilusión que haya culminado mi trabajo. Y como no, no puedo olvidarme de mi sobrino Rubén, que aunque ahora no lo entienda muy bien, espero que algún día pueda estar yo en sus agradecimientos. También, a mi otra familia: Cristóbal, Mari y Jorge, por contagiarme su cariño durante este periodo.

A mis directores de tesis, Dr. José Luis Alonso y Dra. Susana Serrano, por su gran trabajo, sus sabios consejos y por estar siempre dispuestos a ayudarme. Me siento muy afortunado por haber podido compartir esta aventura con vosotros. Gracias de corazón. No lo olvidaré.

A la Entidad Pública de Saneamiento de Aguas Residuales de la Comunidad Valenciana (EPSAR), por la financiación del proyecto: *Estudio integrado del proceso biológico en plantas de tratamiento por fangos activos, análisis de interrelación entre los distintos componentes y optimización de métodos moleculares para la identificación de bacterias formadoras de espumas*, al Grupo de Química y Microbiología del Agua (IIAMA).

A todos los técnicos de laboratorio y jefes de planta de las EDAR Quart-Benàger, Denia-Ondara-Pedreguer, Cuenca del Carraixet y Castellón, por su dedicación y esfuerzo durante el proyecto.

A mi gran familia del Grupo de Química y Microbiología del Agua, por qué siempre me han apoyado y me han dado ánimos: José Luis, Paula Barbarroja, Yolanda, Laura, Paula Santiago, Irene Hortelano, Rutt, Irene Cañigral y Julián. A Inma, especialmente, por llevarme siempre por el “buen camino”. También, a algunos de vosotros que sois como de la familia: Elena, Jorge y Albert, así como a aquellos que dejasteis vuestro “granito de arena” en el Grupo: Liz y Mariela.

A todos vosotros que habéis colaborado en la identificación de bacterias filamentosas: Ana Belén, Verónica, Sara, Josemi, Marta, Sergio y Alba.

A mis grandes amigos del alma: José Luis, Meli y Marian, por sus ánimos, por estar siempre ahí y entender mi ausencia.

A todos aquellos investigadores que me han brindado su ayuda cuando lo he necesitado: Eloy Becarés, Robert J. Seviour, Departamento de Microbiología III de la UCM y Departamento de Estadística de la USAL. A José Morillo, por hacer ese gran esfuerzo y acompañarme por las tardes durante su estancia en Valencia, iniciándome en el mundo de la ecología numérica. A Mari Carmen Pérez y Lucía Sobrados por sus consejos y revisiones. A Héctor Rey por su valiosa ayuda en la ilustración de algunas figuras.

No siempre se debería agradecer al final de una tesis a personas, sino también a aquellos lugares especiales que de alguna manera formaron parte de este esfuerzo. No puedo olvidar a ese maravilloso pueblo de olivos de la provincia de Jaén, Villacarrillo, por esos momentos junto a la chimenea, donde he trabajado tantísimas horas y donde me han surgido muchas de las ideas que he plasmado en mi trabajo. También esos momentos en el corazón de la Sierra de Cazorla, donde su entorno natural cultivó mi inspiración y me ayudó a seguir adelante con fuerza. No puedo olvidar tampoco a una pequeña y singular aldea perdida entre las montañas del Rincón de Ademuz, donde pude respirar los grandes momentos de paz y sosiego que en algunos momentos he necesitado.

He dejado estas últimas líneas para la persona más especial, Sixti, por saber siempre como lidiar la paciencia y la espera con el amor, ayudándome y animándome en cada uno de los momentos más difíciles. Te admiro. Has sido mi gran apoyo y no dispondré de suficientes vidas para agradecértelo, por lo que espero hacerlo en esta. Por todo ello, y por lo que en muy poco tiempo nos va a unir, te dedico mi obra...

A Sixti

Abreviaturas

ARU	Aguas residuales urbanas
ARI	Aguas residuales industriales
EDAR	Estación depuradora de aguas residuales
EDARI	Estación depuradora de aguas residuales industriales
CBR	Contactores biológicos rotatorios
ATP	Adenosin trifosfato
RNA	Ácido ribonucleico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
rDNA	DNA ribosómico
BOA	Bacterias oxidantes de amonio
BON	Bacterias oxidantes de nitrito
AOA	<i>Archaea</i> oxidantes de amonio
EBPR	<i>Enhanced biological phosphorus removal</i>
PAOs	<i>Polyphosphate accumulating organisms</i>
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i>
RAFA	Reactor anaerobio de flujo ascendente
EASC	<i>Extended anaerobic sludge contact</i>
VIP	<i>Virginia Initiative Plant</i>
JHB	<i>Johannesbourg</i>
ISAH	<i>Institut für Siedelugwasserwirtschaft und Abfalltechnik der Universität Hannover</i>
PHA	Poli- β -hidroxialcanoatos
PHB	Poli- β -hidroxibutirato
PHV	Poli- β -hidroxivalerato
GAOs	<i>Glycogen accumulating organisms</i>
SBR	<i>Sequencing batch reactor</i>
SPE	Sustancias poliméricas extracelulares
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
CTC	Cloruro de 5-ciano-2,3-ditoliltetrazolio
IJSEM	<i>International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology</i>
MAR	<i>Microautoradiography</i>
MAC	<i>Microsphere adhesion to cells</i>
ELF	<i>Enzyme-labelled fluorescence</i>
NALO	<i>Nocardia amarae</i> -like organisms
GALO	<i>Gordonia amarae</i> -like organisms
LCFAs	<i>Long-chain fatty acids</i>
SCFAs	<i>Short-chain fatty acids</i>

PTLO	<i>Pine tree-like organisms</i>
Ca.	<i>Candidatus</i>
ZAM	Zona adoral de membranelas
SBI	<i>Sludge biotic index</i>
MBR	<i>Membrane bioreactor</i>
nMDS	<i>Non-metric multidimensional scaling</i>
PCA	<i>Principal component analysis</i>
PCoA	<i>Principal coordinate analysis</i>
DISTLM	<i>Distance-based linear models</i>
CA	<i>Correspondence analysis</i>
PERMANOVA	<i>Permutational multivariate analysis of variance</i>
ANOSIM	<i>Analysis of similarity</i>
RDA	<i>Redundancy analysis</i>
CCA	<i>Canonical correspondence analysis</i>
DCA	<i>Detrended CA</i>
DCCA	<i>Detrended CCA</i>
VIF	<i>Variance inflation factor</i>
db-RDA	<i>Distance-based redundancy analysis</i>
CAP	<i>Canonical analysis of principal coordinates</i>
GLM	<i>Generalized linear model</i>
QB	Quart Benàger (EDAR)
CT	Castellón (EDAR)
DN	Denia-Ondara-Pedreguer (EDAR)
CX	Carraixet (EDAR)
FQAF	Variables fisicoquímicas del afluyente
rX	Rendimiento de la variable X
Xs	Fracción soluble de la variable X, determinada en el filtrado de 0,45 µm
Xf	Fracción filtrada de la variable X, determinada en el filtrado de 1,2 µm
CX	Carga de la variable X
SST	Sólidos en suspensión totales
DQO	Demanda química de oxígeno total
DBO ₅	Demanda biológica de oxígeno a los 5 días
%DQOs	Porcentaje de la DQO soluble
NT	Nitrógeno total
NKT	Nitrógeno kjeldhal total
N-NH ₄ ⁺	Nitrógeno amoniacal
N-NO ₂ ⁻	Nitrógeno nitroso
N-NO ₃ ⁻	Nitrógeno nítrico
Nox	Nitrógeno oxidado (N-NO ₂ ⁻ +N-NO ₃ ⁻)
%N-NO ₂ ⁻	Porcentaje del nitrógeno nitroso respecto al Nox
PT	Fósforo total
P-PO ₄ ³⁻	Fósforo del ortofosfato

AG	Aceites y grasas
AGV	Ácidos grasos volátiles
Prot	Proteínas
Carb	Carbohidratos
S ²⁻	Sulfuros
SO ₄ ²⁻	Sulfatos
Ni	Níquel
Zn	Zinc
TA	Tensioactivos aniónicos
FQLM	Variables fisicoquímicas del licor mezcla
pHLM	pH del licor mezcla
CondLM	Conductividad del licor mezcla
NTLM	Nitrógeno total del licor mezcla
PTLM	Fósforo total del licor mezcla
DQOLM	Demanda química de oxígeno del licor mezcla
SSLM	Sólidos en suspensión del licor mezcla
SSVLM	Sólidos en suspensión volátiles del licor mezcla
%SSVLM	Porcentaje de sólidos en suspensión volátiles del licor mezcla
SSR	Sólidos en suspensión de la recirculación
R. rec	Relación de la recirculación
IVF30	Índice volumétrico del fango a los 30 minutos
IVF5	Índice volumétrico del fango a los 5 minutos
T ^a _r	Temperatura del reactor biológico
OPE	Variables operacionales
X1	Variable X medida en el día anterior al muestreo del LM
X2a	Variable X promedio de los días 1 y 2, anteriores al muestreo del LM
X2b	Variable X promedio de los días 2 y 3, anteriores al muestreo del LM
X3	Variable X promedio de los 3 días anteriores al muestreo del LM
CM	Carga másica, calculada a partir de la DBO ₅
CMDQOs	Carga másica, calculada a partir de la DQO soluble
TRH	Tiempo de retención hidráulico
TRHr	Tiempo de retención hidráulico en el reactor biológico
TRHds	Tiempo de retención hidráulico en el decantador secundario
EF	Edad del fango
EFX	EF, donde X es el n° días anteriores utilizados en el sumatorio de las variables
MCRT	<i>Mean cell residence time</i>
O ₃	Ozono
OD	Oxígeno disuelto
ODa	Porcentaje de tiempo de oxígeno disuelto en el reactor biológico >2 mg/L
ODm	Porcentaje de tiempo de oxígeno disuelto en el reactor biológico entre 0,8 y 2 mg/L
ODb	Porcentaje de tiempo de oxígeno disuelto en el reactor biológico <0,8 mg/L

RESUMEN

El proceso de fangos activos es el sistema de tratamiento biológico más común en la depuración de las aguas residuales urbanas e industriales, siendo este un proceso biotecnológico donde interaccionan multitud de variables biológicas, fisicoquímicas y operacionales para la eliminación de contaminantes. En la actualidad, los principales retos en el sector del tratamiento de las aguas residuales implican la necesidad de avanzar en el control y optimización de los procesos, que permitan encontrar nuevas estrategias y/o nuevos sistemas de tratamiento para el ahorro de los costes de explotación y el cumplimiento de los objetivos de eficiencia energética y calidad en las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR). Además, las restricciones impuestas por la normativa en el vertido de ciertos contaminantes, como son el nitrógeno y el fósforo, obliga a las empresas del sector a realizar importantes modificaciones en la configuración de la planta. Por todo ello, cada vez es más necesario el conocimiento de la dinámica de las poblaciones microbianas que componen la comunidad biológica del sistema, principalmente los protistas, metazoos y bacterias filamentosas. Numerosos estudios han intentado relacionar protistas y metazoos con variables fisicoquímicas y operacionales de las plantas para revelar su valor bioindicador, si bien estos han tenido un carácter principalmente descriptivo y/o exploratorio, y no de interpretación ambiental. Respecto al estudio de las poblaciones de bacterias filamentosas en fangos activos, a menudo relacionadas con episodios de *bulking* y *foaming*, estos se han centrado principalmente en el esclarecimiento de su posición taxonómica y ecofisiología *in situ*, presencia y distribución, así como en el estudio de las medidas para su control, siendo también muy escasos los trabajos publicados sobre interpretación ambiental. Por otro lado, las variables ambientales (operacionales y fisicoquímicas) empleadas para explicar la variabilidad de protistas, metazoos y bacterias filamentosas en fangos activos han sido escasas y algunas de ellas están muy poco exploradas.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriormente descritas, el objetivo general planteado en la presente tesis doctoral ha sido dilucidar las relaciones significativas entre variables biológicas (protistas, metazoos y bacterias filamentosas) y fisicoquímicas y operacionales en diversas plantas de fangos activos, lo cual nos ha permitido una interpretación ecológica de los procesos que tienen lugar en los reactores biológicos, proponiendo así nuevas herramientas para la monitorización del proceso y el avance en el conocimiento de aquellos microorganismos filamentosos que causan problemas en las instalaciones. Para el cumplimiento de los objetivos de esta tesis doctoral se tomaron, con una frecuencia quincenal y durante un año, muestras de fango activo, agua residual afluyente y efluente tratado, procedentes de seis biorreactores de cuatro EDAR de la Comunidad Valenciana (España). La estimación de la densidad absoluta de protistas y metazoos se llevó a cabo mediante recuento directo con microscopía de contraste de fases, mientras que la abundancia de las bacterias filamentosas se realizó utilizando microscopía convencional y la técnica de hibridación *in situ* con sondas 16S/23S rDNA marcadas con fluoróforos (FISH). Ambos conjuntos de variables, ambientales y biológicas, fueron explorados individualmente según los factores biorreactor y estacional, empleando rutinas estadísticas multivariantes no paramétricas.

Posteriormente, se aplicó un doble enfoque (lineal y unimodal) para la búsqueda de modelos de interpretación ambiental de las variables biológicas, empleando modelos lineales basados en la distancia (DISTLM), así como el análisis de correspondencias canónico (CCA).

Los resultados obtenidos indican que la dinámica poblacional de protistas y metazoos se encuentra influida en muchos casos por ambos factores, estacional y biorreactor (configuración, diseño y variables fisicoquímicas), siendo este último el que influye principalmente en la dinámica de las bacterias filamentosas. En el caso de protistas y metazoos, se han propuesto nuevos bioindicadores del proceso de nitrificación, proponiéndose además las variables rNKTs (rendimiento del nitrógeno kjeldhal total soluble) y %N-NO₂⁻ (porcentaje de nitrógeno nitroso respecto al nitrógeno oxidado) como las más adecuadas para la búsqueda de bioindicadores del rendimiento e inestabilidad, respectivamente, en el proceso biológico de eliminación del nitrógeno. Por otro lado, la exploración exhaustiva de las variables ambientales ha determinado la conveniencia de su categorización, así como el estudio de la inercia biológica de las variables operacionales, anterior a la construcción de los modelos. Además, recomendamos que la interpretación ecológica en cada uno de los biorreactores sea prioritaria a su interpretación conjunta. Los modelos construidos a partir del DISTLM y CCA han aportado información relevante sobre las relaciones entre protistas y metazoos y algunas variables de control de planta, permitiendo su interpretación ecológica y la obtención de bioindicadores para la monitorización del proceso biológico en fangos activos. Entre las variables de control, la carga de fósforo total ha resultado ser el factor con mayor influencia en la variabilidad de las comunidades biológicas, siendo por tanto una variable alternativa a la carga másica. Por último, los resultados obtenidos sobre identificación y cuantificación de bacterias filamentosas nos han permitido constatar que los resultados de la microscopía convencional no son comparables con aquellos obtenidos a partir de la técnica FISH, excepto en los casos de *Microthrix parvicella* y GALO (*Gordonia amarae*-like organisms). Además, la construcción de modelos permite asociar las distintas bacterias filamentosas a diferentes rangos ambientales, obteniendo una información valiosa para el conocimiento de su dinámica poblacional.

RESUM

El procés de fangs actius és el sistema de tractament biològic més comú en la depuració de les aigües residuals urbanes i industrials, sent aquest un procés biotecnològic on interaccionen multitud de variables biològiques, fisicoquímiques i operacionals per a l'eliminació de contaminants. En l'actualitat, els principals reptes en el sector del tractament de les aigües residuals impliquen la necessitat d'avançar en el control i optimització dels processos, que permeten trobar noves estratègies i/o nous sistemes de tractament per a l'estalvi dels costos d'explotació i el compliment dels objectius d'eficiència energètica i qualitat en les estacions depuradores d'aigües residuals (EDAR). A més, les restriccions imposades per la normativa en l'abocament de certs contaminants, com són el nitrogen i el fòsfor, obliga a les empreses del sector a realitzar importants modificacions en la configuració de la planta. Per tot això, cada vegada és més necessari el coneixement de la dinàmica de les poblacions microbianes que componen la comunitat biològica del sistema, principalment els protists, metazous i bacteris filamentosos. Nombrosos estudis han intentat relacionar protists i metazous amb variables fisicoquímiques i operacionals de les plantes per a revelar el seu valor bioindicador, si bé estos han tingut un caràcter principalment descriptiu i/o explorador, i no d'interpretació ambiental. Respecte a l'estudi de les poblacions de bacteris filamentosos en fangs actius, sovint relacionades amb episodis de *bulking* i *foaming*, estos s'han centrat principalment en l'esclariment de la seua posició taxonòmica i ecofisiologia *in situ*, presència i distribució, així com en l'estudi de les mesures per al seu control, sent també molt escassos els treballs publicats sobre interpretació ambiental. D'altra banda, les variables ambientals (operacionals i fisicoquímiques) empleades per a explicar la variabilitat de protists, metazous i bacteris filamentosos en fangs actius han sigut escasses i algunes d'elles estan molt poc explorades.

Tenint en compte les consideracions anteriorment descrites, l'objectiu general plantejat en la present tesi doctoral ha sigut dilucidar les relacions significatives entre variables biològiques (protistas, metazous i bacteris filamentosos) i fisicoquímiques i operacionals en diverses plantes de fangs actius, la qual cosa ens ha permés una interpretació ecològica dels processos que tenen lloc en els reactors biològics, proposant així noves ferramentes per a la monitorització del procés i l'avanç en el coneixement d'aquells microorganismes filamentosos que causen problemes en les instal·lacions. Per al compliment dels objectius d'esta tesi doctoral es van prendre amb una freqüència quinzenal i durant un any, mostres de fang actiu, aigua residual afluent i efluent tractat, procedents de sis bioreactors de quatre EDAR de la Comunitat Valenciana (Espanya). L'estimació de la densitat absoluta de protists i metazous es va dur a terme per mitjà de recompte directe amb microscopia de contrast de fases, mentres que l'abundància dels bacteris filamentosos es va realitzar utilitzant microscòpia convencional i la tècnica d'hibridació *in situ* amb sondes 16S/23S rDNA marcades amb fluoròfors (FISH). Ambdós conjunts de variables, ambientals i biològiques, van ser explorats individualment segons els factors bioreactor i estacional, emprant rutines estadístiques multivariants no paramètriques. Posteriorment, es va aplicar un doble enfocament (lineal i unimodal)

per a la recerca de models d'interpretació ambiental de les variables biològiques, emprant models lineals basats en la distància (DISTLM) , així com l'anàlisi de correspondències canònic (CCA).

Els resultats obtinguts indiquen que la dinàmica poblacional de protists i metazous es troba influïda en molts casos per ambdós factors, estacional i bioreactor (configuració, disseny i variables fisicoquímiques), sent aquest últim el que influeix principalment en la dinàmica dels bacteris filamentosos. En el cas de protists i metazous, s'han proposat nous bioindicadors del procés de nitrificació, proposant-se a més les variables rNKTs (rendiment del nitrogen kjeldhal total soluble) i %N-NO₂⁻ (percentatge del nitrogen nitrós respecte al nitrogen oxidat) com les més adequades per a la recerca de bioindicadors del rendiment i inestabilitat, respectivament, en el procés biològic d'eliminació del nitrogen. D'altra banda, l'exploració exhaustiva de les variables ambientals ha determinat la conveniència de la seua categorització, així com l'estudi de la inèrcia biològica de les variables operacionals, prèvia a la construcció dels models. A més, recomanem que la interpretació ecològica en cada uns dels bioreactors siga prioritària a la seua interpretació conjunta. Els models construïts a partir del DISTLM i CCA han aportat informació rellevant sobre les relacions entre protists i metazous i algunes variables de control de planta, permetent la seua interpretació ecològica i l'obtenció de bioindicadors per a la monitorització del procés biològic en fangs actius. Entre les variables de control, la càrrega de fòsfor total ha resultat ser el factor amb major influència en la variabilitat de les comunitats biològiques, sent per tant una variable alternativa a la càrrega massica. Finalment, els resultats obtinguts sobre identificació i quantificació de bacteris filamentosos ens han permés constatar que els resultats de la microscopia convencional no són comparables amb aquells obtinguts a partir de la tècnica FISH excepte en els casos de *Microthrix parvicella* i *Gordonia amarae* like-organisms (GALO). A més, la construcció de models permet associar els distints bacteris filamentosos a diferents rangs ambientals, obtenint una informació valuosa per al coneixement de la seua dinàmica poblacional.

ABSTRACT

The active sludge process is the most common biological treatment used for the removal of pollutants in urban and industrial wastewater, being this a biotechnological process in which multitude of biological, physicochemical and operational variables interact. Nowadays, the main challenges in the wastewater treatment sector entail the need to advance in the control and optimization of the processes. New strategies and/or treatment systems are in continuous development, in order to decrease the operational costs and to compliance the energy efficiency and quality objectives of wastewater treatment plants (WWTPs). In addition, the restrictions imposed in the discharge of certain pollutants, such as nitrogen and phosphorus, force modifications in the configuration of the treatment plants. Therefore, it is increasingly necessary to deepen knowledge of the dynamic of the microbial populations in activated sludge, mainly protists, metazoans and filamentous bacteria. Many studies have attempted to relate protists and metazoans to physicochemical and operational variables of WWTPs in order to reveal their possible value as bioindicators. However, these studies have been mainly descriptive and/or exploratory, and moreover they have not focused on the environmental interpretation. Studies about the dynamics of filamentous bacteria population in activated sludge, often related to bulking and foaming episodes, have mainly focused on the elucidation of the taxonomic position, in situ ecophysiology, presence and distribution, as well as strategies for controlling the populations. However, the published works about the biological process from the point of view of the environmental interpretation is still scarce. On the other hand, the environmental variables (operational and physicochemical) used to explain the variability of protists, metazoans and filamentous bacteria in activated sludge have been scarce and some of them are poorly explored.

Taking into account the previous considerations, the general objective of the present doctoral thesis has been to elucidate the relationships between biological variables (protists, metazoans and filamentous bacteria) and physicochemical and operational variables in WWTPs. This has allowed to carried out an ecological interpretation of the processes that take place in the biological reactors, and to propose new tools for monitoring the process and the advance in the knowledge of those filamentous bacteria that cause problems in the treatment plants. To accomplishment the objectives of this doctoral thesis, samples from activated sludge, influent and treated effluent were collected every fifteen days from six bioreactors belonging to four different WWTPs located in Valencian Community (Spain). The estimation of the absolute density of protists and metazoans was carried out by direct counting under phase contrast microscopy, while the abundance of filamentous bacteria was performed by using the conventional microscopy and a molecular biological technique: fluorescent in situ hybridization (FISH). Environmental and biological variables were independently explored according to bioreactor and seasonal factors, using multivariate non-parametric statistical routines. Subsequently, a dual approach (linear and unimodal) was applied to investigate models of environmental interpretation of biological variables, using distance-based linear models (DISTLM), as well as the canonical correspondence analysis (CCA).

The results obtained indicate that the dynamics of protists and metazoans populations are influenced by season and bioreactor characteristics. Also, the factor that explain the dynamics of filamentous bacteria is the bioreactor factor (configuration, design and physicochemical characteristics). In this study we have proposed certain protists and metazoa as new bioindicators of the nitrification process, and the variables removal efficiency of soluble TKN (total kjeldahl nitrogen) and %N-NO₂⁻ (percentage of nitrous nitrogen with respect to oxidized nitrogen) as the most suitable variables to search bioindicators in the performance and instability, respectively, in the biological nitrogen removal process. On the other hand, the exhaustive exploration of the environmental variables has determined the suitability of its categorization, as well as the study of the biological inertia of the operational variables, prior to the construction of the models. In addition, it is advisable that the ecological interpretation in each bioreactor will be more priority than their joint interpretation. The multivariate models constructed with DISTLM and CCA have provided relevant information about the relationships between protists and metazoans and some plant control variables, allowing their ecological interpretation and obtaining bioindicators for monitoring the biological process in active sludge. Among the control variables, total phosphorus loading rate has proved to be the most influential variable in the variability of the biological communities, being therefore an alternative variable to organic loading rate. Finally, the results obtained on the identification and quantification of filamentous bacteria have verified that the results of the conventional microscopy are not comparable with those obtained from the FISH technique, except in the cases of *Microthrix parvicella* and GALO (*Gordonia amarae*-like organisms). In addition, the construction of models allows associating the filamentous bacteria to environmental ranges, obtaining valuable information to the knowledge of these dynamic populations.

ÍNDICE

CAPÍTULO I.- INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Importancia de la depuración de las aguas residuales.....	3
1.2 Legislación.....	4
1.3 Depuración biológica de las aguas residuales.....	5
1.3.1 Clasificación de los tratamientos biológicos.....	5
1.3.2 Procesos bioquímicos.....	7
1.3.3 Principales estrategias empleados en la eliminación de materia orgánica y nutrientes.....	14
1.4 Principales parámetros operacionales de diseño en EDAR.....	21
1.4.1 Carga másica y edad del fango.....	21
1.4.2 Tiempo de retención hidráulico.....	22
1.4.3 Oxígeno disuelto.....	23
1.5 El flóculo como unidad fundamental estructural y funcional del fango activo.....	23
1.6 La comunidad biótica del fango activo.....	24
1.7 Aqueobacterias y Bacterias.....	26
1.7.1 Bacterias quimiorganoheterótrofas.....	26
1.7.2 Bacterias relacionadas con el proceso de nitrificación.....	27
1.7.3 Bacterias relacionadas con el proceso de desnitrificación.....	28
1.8 Bacterias filamentosas.....	29
1.8.1 Aspectos históricos. Los primeros pasos hacia el sistema de identificación convencional..	30
1.8.2 Identificación de bacterias filamentosas.....	32
1.8.3 Problemas de separación del fango activo.....	42
1.9 Protistas.....	61
1.9.1 El papel de los protistas en el tratamiento del agua residual.....	63
1.9.2 Identificación y clasificación de protistas en fangos activos.....	65
1.9.3 Los protozoos como bioindicadores del rendimiento del proceso de fangos activos.....	74
1.9.4 Recuento de ciliados en fangos activos.....	77
1.10 Metazoos.....	78
1.10.1 Rotíferos.....	78
1.10.2 Nematodos.....	80
1.10.3 Anélidos.....	81
1.10.4 Gastrotricos.....	81

1.11 Principales técnicas de ordenación multivariante empleadas en estudios de ecología.....	82
1.11.1 Pretratamiento de los datos: los primeros pasos después de la fase experimental.....	83
1.11.2 Análisis exploratorio multivariante.....	86
1.11.3 Interpretación ambiental: rutinas multivariantes empleadas en el estudio de la relación entre variables biológicas y ambientales.....	90
1.12 Enfoques estadísticos utilizados para el estudio de la relación entre protistas, metazoos y bacterias filamentosas y variables ambientales en fangos activos.....	96
CAPÍTULO II.- OBJETIVOS.....	101
CAPÍTULO III.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	105
3.1 Toma de muestras.....	105
3.2 Variables fisicoquímicas.....	108
3.3 Variables operacionales.....	110
3.4 Variables biológicas.....	111
3.4.1 Protistas y metazoos.....	111
3.4.2 Bacterias filamentosas.....	113
3.5 Análisis de los datos.....	125
CAPÍTULO IV.- RESULTADOS.....	131
4.1 Dinámica poblacional de protistas y metazoos en respuesta al factor biorreactor-estacional.....	131
4.2 Protistas y metazoos bioindicadores del proceso de eliminación del nitrógeno.....	141
4.2.1 Descripción de los modelos lineales de regresión múltiple multivariante basados en la distancia.....	148
4.2.2 Descripción de los modelos de ordenación basados en el análisis de correspondencias canónico.....	163
4.3 Influencia de las variables operacionales y fisicoquímicas en la dinámica poblacional de la comunidad de protistas y metazoos.....	167
4.3.1 Exploración de la inercia biológica de las variables operacionales.....	167
4.3.2 Búsqueda de modelos de interpretación ambiental.....	173
4.4 Dinámica poblacional de la comunidad de bacterias filamentosas en respuesta al factor biorreactor y estacional.....	223
4.5 Influencia de las variables operacionales y fisicoquímicas en la dinámica poblacional de la comunidad de bacterias filamentosas.....	232
4.5.1 Exploración de la inercia biológica de las variables operacionales.....	232
4.5.2 Búsqueda de modelos de interpretación ambiental.....	234

4.6 Relación entre la comunidad de bacterias filamentosas y los componentes del nitrógeno.....	258
CAPÍTULO V.- DISCUSIÓN.....	267
5.1 Dinámica poblacional de protistas y metazoos en respuesta al factor biorreactor y estacional.....	268
5.2 Protistas y metazoos bioindicadores del proceso de eliminación del nitrógeno.....	270
5.2.1 Flagelados.....	278
5.2.2 Amebas.....	280
5.2.3 Ciliados.....	283
5.2.4 Metazoos.....	293
5.3 Influencia de las variables operacionales y fisicoquímicas en la dinámica poblacional de la comunidad de protistas y metazoos.....	295
5.3.1 Exploración de la inercia biológica de las variables operacionales.....	297
5.3.2 Búsqueda de modelos de interpretación ambiental.....	300
5.3.2.1 Flagelados.....	312
5.3.2.2 Amebas.....	316
5.3.2.3 Ciliados.....	320
5.3.2.4 Metazoos.....	348
5.4 Dinámica poblacional de la comunidad de bacterias filamentosas en respuesta al factor biorreactor y estacional.....	351
5.4.1 Búsqueda de modelos de interpretación ambiental.....	354
CAPÍTULO VI.- CONCLUSIONES.....	395
CAPÍTULO VII.- BIBLIOGRAFÍA.....	401
CAPÍTULO VIII.- ANEXO.....	445

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I.- INTRODUCCIÓN

Figura 1.1. Esquema básico del proceso de fangos activos.....	6
Figura 1.2. Transformaciones del nitrógeno en el proceso de nitrificación-desnitrificación vía nitrato.....	10
Figura 1.3. Esquema de eliminación biológica del fósforo.....	14
Figura 1.4. Esquema Ludzack-Ettinger modificado.....	16
Figura 1.5. Esquema Bardenpho.....	17
Figura 1.6. Esquema A/O.....	18
Figura 1.7. Esquema A ² /O.....	19
Figura 1.8. Estructura flocular.....	24
Figura 1.9. Árbol filogenético de la vida.....	25
Figura 1.10. Problemas de separación del fango activo.....	29
Figura 1.11. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen 16S rRNA.....	40
Figura 1.12. Problemas de <i>foaming</i> en planta.....	44
Figura 1.13. Mecanismo de formación del <i>foaming</i>	46
Figura 1.14. Estructura flocular relacionada con episodios de <i>bulking</i> filamentoso.....	55
Figura 1.15. Características morfológicas más comunes del grupo de los flagelados.....	68
Figura 1.16. Características morfológicas de amebas desnudas y testáceas.....	69
Figura 1.17. Grupos funcionales de ciliados.....	70
Figura 1.18. Características morfológicas de los protistas ciliados.....	74
Figura 1.19. Grupos principales de metazoos en sistemas de tratamiento de aguas residuales.....	82
Figura 1.20. Gráfico de dispersión de puntos entre las variables EF y CPT, e histogramas de frecuencia de la EF.....	85

CAPÍTULO III.- MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 3.1. Vista aérea de la EDAR QB.....	105
Figura 3.2. Vista aérea de la EDAR CX.....	106
Figura 3.3. Vista aérea de la EDAR DN.....	107
Figura 3.4. Vista aérea de la EDAR CT.....	107

CAPÍTULO IV.- RESULTADOS

Figura 4.1. Diagrama de la frecuencia de aparición de las especies de protistas y metazoos.....	131
Figura 4.2. Protistas más frecuentes.....	132
Figura 4.3. <i>Ranking</i> del promedio de abundancia absoluta de ciliados.....	133
Figura 4.4. Ciliados dominantes.....	133
Figura 4.5. Porcentaje del promedio de abundancia absoluta de los grupos taxonómicos de ciliados en los biorreactores QB, CT1 y CT2.....	134
Figura 4.6. Porcentaje del promedio de abundancia absoluta de grupos taxonómicos de ciliados en los biorreactores CXAB, CXCD y DN.....	135
Figura 4.7. Análisis clúster y nMDS a partir de la densidad de protistas y metazoos, según el factor biorreactor.....	136
Figura 4.8. nMDS a partir de la densidad de protistas y metazoos, según el factor biorreactor (CT)...	136

Figura 4.9. nMDS a partir de la densidad de los grupos de protistas y metazoos, según el factor biorreactor.....	137
Figura 4.10. CAP a partir de la densidad de protistas y metazoos, según el factor estacional.....	139
Figura 4.11. CAP a partir de la densidad de grupos de protistas y metazoos, según el factor estacional.....	140
Figura 4.12. Valores promedio y desviación estándar de las fracciones del nitrógeno del efluente en los biorreactores.....	142
Figura 4.13. Diagrama de cajas y bigotes del rNT en los biorreactores.....	143
Figura 4.14. nMDS a partir de los componentes del nitrógeno del efluente, según el factor biorreactor.....	144
Figura 4.15. Gráfico de burbujas del CAP a partir de los componentes del nitrógeno, según el factor biorreactor.....	146
Figura 4.16. Gráfico de burbujas del N-NH ₄ ⁺ en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre componentes del nitrógeno y densidad de protistas y metazoos en QB.....	150
Figura 4.17. Gráfico de burbujas del N-NH ₄ ⁺ en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre componentes del nitrógeno y densidad de protistas y metazoos en CX.....	152
Figura 4.18. Gráfico de burbujas del NTs y N-NO ₃ ⁻ en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre componentes del nitrógeno y densidad de protistas y metazoos en CT1.....	153
Figura 4.19. Gráfico de burbujas del NTs en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre los componentes del nitrógeno y densidad de protistas y metazoos en CT2.....	155
Figura 4.20. Gráfico de burbujas del NTs y N-NO ₃ ⁻ en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre componentes del nitrógeno y densidad de protistas y metazoos en DN.....	156
Figura 4.21. Gráfico de burbujas del N-NH ₄ ⁺ en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre componentes del nitrógeno y la densidad de protistas y metazoos de la matriz total....	158
Figura 4.22. Gráfico de burbujas del rNKTs en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre componentes del nitrógeno y densidad de protistas y metazoos de la matriz total.....	160
Figura 4.23. Gráfico de burbujas del N-NO ₃ ⁻ en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre componentes del nitrógeno y densidad de protistas y metazoos de la matriz total.....	160
Figura 4.24. Gráfico de burbujas del rNTs en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre componentes del nitrógeno y densidad de protistas y metazoos de la matriz total.....	161
Figura 4.25. Gráfico de burbujas del rNKTs en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre componentes del nitrógeno y densidad de grupos de protistas y metazoos de la matriz total.....	162
Figura 4.26. Biplot del análisis de correspondencias canónico representando las muestras de los distintos biorreactores con respecto a los componentes del nitrógeno seleccionados.....	165
Figura 4.27. Biplot del análisis de correspondencias canónico representando el proceso de nitrificación a través de la relación entre protistas y metazoos y los componentes del nitrógeno.....	166
Figura 4.28. Caudal diario de purga de fangos en exceso de los biorreactores.....	167
Figura 4.29. Promedio y desviación estándar de la serie EF1-EF7 en los biorreactores.....	168
Figura 4.30. Diagrama de cajas y bigotes de la EF en los biorreactores.....	170
Figura 4.31. Diagrama de cajas y bigotes de la CM en los biorreactores.....	170
Figura 4.32. Diagrama de cajas y bigotes del TRHr en los biorreactores.....	171
Figura 4.33. Diagrama de cajas y bigotes del TRHds en los biorreactores.....	171

Figura 4.34. Diseño de los biorreactores.....	173
Figura 4.35. nMDS a partir de las variables ambientales, según el factor biorreactor.....	175
Figura 4.36. nMDS a partir de las variables ambientales, según el factor estacional.....	176
Figura 4.37. CAP a partir de las variables ambientales, según el factor estacional.....	178
Figura 4.38. CAP a partir de las variables ambientales, según el factor biorreactor.....	179
Figura 4.39. Coeficientes de correlación de la rutina BIO-ENV utilizando como indicador la tipología de las variables.....	182
Figura 4.40. Estructura flocular en los biorreactores.....	186
Figura 4.41. Gráfico de burbujas de la CM y el TRHds en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables OPE y la densidad de protistas y metazoos en QB.....	190
Figura 4.42. Gráfico de burbujas de la EF en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables OPE y la densidad de protistas y metazoos en CXAB y CXCD.....	191
Figura 4.43. Gráfico de burbujas del TRHr, CO ₃ y EF en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables OPE y la densidad de protistas y metazoos en CT1 y CT2.....	193
Figura 4.44. Gráfico de burbujas de la EF en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables OPE y la densidad de protistas y metazoos en DN.....	194
Figura 4.45. Gráfico de burbujas de la EF en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables OPE y la densidad de protistas y metazoos en la matriz total.....	195
Figura 4.46. Gráfico de burbujas de la CondLM y la EF en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables FQLM y la densidad de protistas y metazoos en QB.....	197
Figura 4.47. Gráfico de burbujas del IVF30 y la T ^{ar} en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables FQLM y la densidad de protistas y metazoos en CT1.....	200
Figura 4.48. Gráfico de burbujas del IVF30 y la T ^{ar} en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables FQLM y la densidad de protistas y metazoos en CT2.....	201
Figura 4.49. Gráfico de burbujas de la T ^{ar} en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables FQLM y la densidad de protistas y metazoos en la matriz total.....	202
Figura 4.50. Gráfico de burbujas de la CPT en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables FQAF y la densidad de protistas y metazoos en CXCD.....	204
Figura 4.51. Gráfico de burbujas del %DQOs en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables FQAF y la densidad de protistas y metazoos en CT2.....	206
Figura 4.52. Gráfico de burbujas de la CPT en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables FQAF y la densidad de protistas y metazoos en la matriz total.....	207
Figura 4.53. Gráfico de burbujas de la CPT en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables OPE, FQLM y FQAF, y la densidad de protistas y metazoos en la matriz total.....	209
Figura 4.54. Biplot del CCA representando la relación entre variables OPE y protistas y metazoos en CX.....	211
Figura 4.55. Biplot del CCA representando la relación entre variables OPE y protistas y metazoos en CT1.....	213
Figura 4.56. Biplot del CCA representando la relación entre variables OPE y protistas y metazoos en la matriz total.....	214
Figura 4.57. Biplot del CCA representando la relación entre variables FQLM y protistas y metazoos en CX.....	216

Figura 4.58. Biplot del CCA representando la relación entre variables FQLM y protistas y metazoos en la matriz total.....	218
Figura 4.59. Biplot del CCA representando la relación entre variables FQAF y protistas y metazoos en CX.....	219
Figura 4.60. Biplot del CCA representando la relación entre variables FQAF y protistas y metazoos en CT1.....	221
Figura 4.61. Biplot del CCA representando la relación entre variables FQAF y protistas y metazoos en la matriz total.....	222
Figura 4.62. Composición relativa de los morfotipos filamentosos durante el periodo de estudio.....	223
Figura 4.63. Morfotipos filamentosos.....	224
Figura 4.64. Composición relativa de las sondas 16S rDNA hibridadas en cada uno de los biorreactores.....	225
Figura 4.65. Composición relativa de las bacterias <i>Nostocoida limicola</i> identificadas en la EDAR QB, CX y DN.....	226
Figura 4.66. Composición relativa de bacterias del género <i>Microthrix</i> identificadas en la EDAR CX.....	227
Figura 4.67. Análisis clúster y nMDS a partir de la densidad de bacterias filamentosas, según el factor biorreactor.....	227
Figura 4.68. nMDS y gráfico de burbujas de la EF a partir de la densidad de bacterias filamentosas en CX, según el factor biorreactor.....	228
Figura 4.69. CAP a partir de la densidad de bacterias filamentosas, según el factor estacional.....	230
Figura 4.70. CAP a partir de la densidad de bacterias filamentosas, según el factor biorreactor.....	231
Figura 4.71. Gráfico de burbujas del TRHds y la R. rec. en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables OPE y bacterias filamentosas en QB.....	242
Figura 4.72. Gráfico de burbujas de la EF en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables OPE y bacterias filamentosas en CX.....	243
Figura 4.73. Gráfico de burbujas de la CO ₃ y los SSLM en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables FQLM y bacterias filamentosas en CT.....	244
Figura 4.74. Gráfico de burbujas del ODb en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables OPE y bacterias filamentosas en DN.....	245
Figura 4.75. Gráfico de burbujas de los SSLM en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables OPE y bacterias filamentosas a partir de la matriz total.....	247
Figura 4.76. Gráfico de burbujas del TRHr en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables OPE y bacterias filamentosas a partir de la matriz total.....	247
Figura 4.77. Gráfico de burbujas de la CondLM en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables FQLM y bacterias filamentosas en QB.....	249
Figura 4.78. Gráfico de burbujas del NTLM en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables FQLM y bacterias filamentosas en CX.....	250
Figura 4.79. Gráfico de burbujas de la T ^a r en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables FQLM y bacterias filamentosas en DN.....	252
Figura 4.80. Gráfico de burbujas de la CNT y CAG en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables FQLM y bacterias filamentosas en QB.....	254
Figura 4.81. Gráfico de burbujas de la CPT, CAG y CCarb en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables FQAF y bacterias filamentosas en CX.....	256

Figura 4.82. Gráfico de burbujas del N-NO ₂ ⁻ en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre los componentes del nitrógeno y bacterias filamentosas en QB.....	260
Figura 4.83. Gráfico de burbujas del %N-NO ₂ ⁻ en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre los componentes del nitrógeno y bacterias filamentosas en CX.....	261
Figura 4.84. Gráfico de burbujas del rNKTs y el N-NH ₄ ⁺ en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre los componentes del nitrógeno y bacterias filamentosas <i>Nostocoida limicola</i>	263
Figura 4.85. Gráfico de burbujas del N-NO ₃ ⁻ en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre los componentes del nitrógeno y bacterias filamentosas a partir de la matriz total.....	264
Figura 4.86. Gráfico de burbujas del N-NH ₄ ⁺ en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre los componentes del nitrógeno y bacterias filamentosas a partir de la matriz total.....	264

CAPITULO VIII.- ANEXO

Figura 8.1. Abundancia absoluta de bacterias filamentosas en QB, representada a través del trazado sombreado (<i>shade plot</i>).....	455
Figura 8.2. Abundancia absoluta de bacterias filamentosas en CXAB, representada a través del trazado sombreado (<i>shade plot</i>).....	455
Figura 8.3. Abundancia absoluta de bacterias filamentosas en CXCD, representada a través del trazado sombreado (<i>shade plot</i>).....	456
Figura 8.4. Abundancia absoluta de bacterias filamentosas en CT1 representada a través del trazado sombreado (<i>shade plot</i>).....	456
Figura 8.5. Abundancia absoluta de bacterias filamentosas en CT2 representada a través del trazado sombreado (<i>shade plot</i>).....	457
Figura 8.6. Abundancia absoluta de bacterias filamentosas en DN, representada a través del trazado sombreado (<i>shade plot</i>).....	457
Figura 8.7. Morfotipo 021N*.....	461
Figura 8.8. Morfotipo <i>M. parvicella</i> *.....	462
Figura 8.9. Morfotipo CX-02.....	463
Figura 8.10. Morfotipo CX-03.....	464
Figura 8.11. Bacterias del morfotipo <i>Haliscomenobacter hydrossis</i> hibridando positivamente con sondas 16S rDNA.....	465
Figura 8.12. Bacterias del morfotipo 0803 hibridando positivamente con sondas 16S rDNA.....	465
Figura 8.13. Bacterias del morfotipo 0904 hibridando positivamente con sondas 16S rDNA.....	466
Figura 8.14. Bacterias del morfotipo 0092 hibridando positivamente con sondas 16S rDNA.....	466
Figura 8.15. Bacterias del género <i>Thiothrix</i> hibridando positivamente con sondas 16S rDNA.....	467
Figura 8.16. Bacterias del morfotipo <i>Nostocoida limicola</i> III hibridando positivamente con sondas 16S rDNA.....	468
Figura 8.17. Bacterias del morfotipo <i>M. parvicella</i> hibridando positivamente con sondas 16S rDNA... ..	469
Figura 8.18. Esquema de tratamiento de la EDAR QB.....	469
Figura 8.19. Esquema de tratamiento de la EDAR CX.....	470
Figura 8.20. Esquema de tratamiento de la EDAR DN.....	470
Figura 8.21. Esquema de tratamiento de la EDAR CT.....	471

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO I.- INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1. Límites máximos admisibles en el vertido del agua residual.....	5
Tabla 1.2. Principales estudios realizados en el mundo sobre ocurrencia de bacterias filamentosas en sistemas de fangos activos.....	33
Tabla 1.3. Problemas asociados con la separación de la biomasa del fango activo en clarificadores....	43
Tabla 1.4. Bacterias identificadas en espumas de fangos activos por microscopía convencional en distintos estudios.....	49
Tabla 1.5. <i>Ranking</i> de los organismos filamentosos más abundantes que causan <i>bulking</i> en sistemas de fangos activos que tratan aguas residuales industriales y urbanas.....	54

CAPÍTULO III.- MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 3.1. Esquema de los muestreos.....	108
Tabla 3.2. Esquema de los parámetros fisicoquímicos determinados en el afluente al reactor y efluente del decantador secundario.....	109
Tabla 3.3. Esquema de los parámetros fisicoquímicos determinados en el licor mezcla.....	109
Tabla 3.4. Esquema de los parámetros operacionales utilizados.....	110
Tabla 3.5. Escala criterio subjetivo para la estimación de la densidad de microorganismos filamentosos.....	117
Tabla 3.6. Cantidades de formamida y agua utilizadas para la preparación de la solución de hibridación.....	121
Tabla 3.7. Cantidades de NaCl para la solución de lavado.....	122
Tabla 3.8. Sondas de oligonucleótidos y morfotipos utilizados en la identificación de bacterias filamentosas.....	124

CAPÍTULO IV.- RESULTADOS

Tabla 4.1. ANOSIM cruzado de 2 vías a partir de las abundancias absolutas de las variables biológicas, según el factor biorreactor-estacional.....	138
Tabla 4.2. Resultados de la validación cruzada de la rutina CAP a partir de las variables biológicas y según el factor estacional.....	140
Tabla 4.3. Contribución de protistas y metazoos a la disimilitud entre biorreactores (rutina SIMPER).....	141
Tabla 4.4. Prueba de Kruskal-Wallis de los componentes del nitrógeno del efluente, según el factor biorreactor y estacional.....	143
Tabla 4.5. ANOSIM de 1 vía a partir de los componentes del nitrógeno del efluente, según el factor biorreactor.....	145
Tabla 4.6. Valores propios, variabilidad explicada por los nuevos ejes de variación del PCA y coeficientes de contribución de los componentes del nitrógeno.....	147
Tabla 4.7. <i>Ranking</i> de las mejores combinaciones de componentes del nitrógeno y correlaciones de Spearman para protistas y metazoos, y sus grupos (rutina BIO-ENV).....	148
Tabla 4.8. Porcentaje de variación explicada de protistas y metazoos por los ejes individuales en la rutina DISTLM en cada uno de los biorreactores y a partir de los componentes del nitrógeno.....	149

Tabla 4.9 Coeficientes de correlación múltiple parcial de los componentes del nitrógeno y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbrDA en QB.....	150
Tabla 4.10. Coeficientes de correlación múltiple parcial de los componentes del nitrógeno y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbrDA en CX.....	151
Tabla 4.11. Coeficientes de correlación múltiple parcial de los componentes del nitrógeno y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbrDA en CT1.....	153
Tabla 4.12. Coeficientes de correlación múltiple parcial de los componentes del nitrógeno y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbrDA en CT2.....	154
Tabla 4.13. Coeficientes de correlación múltiple parcial de los componentes del nitrógeno y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbrDA en DN.....	156
Tabla 4.14. Porcentaje de la variación explicada por los ejes individuales de la rutina DISTLM entre componentes del nitrógeno y la densidad de protistas y metazoos, y sus grupos.....	157
Tabla 4.15. Coeficientes de correlación múltiple parcial de los componentes del nitrógeno y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbrDA en la matriz total.....	159
Tabla 4.16. Coeficientes de correlación múltiple parcial de los componentes del nitrógeno y correlaciones de Pearson de los grupos con los ejes del dbrDA en la matriz total.....	162
Tabla 4.17. Resultados del análisis de correspondencia canónico entre los componentes del nitrógeno y protistas y metazoos.....	164
Tabla 4.18. <i>Ranking</i> de protistas y metazoos respecto a la aproximación del valor óptimo de los componentes del nitrógeno.....	166
Tabla 4.19. Coeficientes de correlación de Spearman de la rutina BIO-ENV de la serie EF1-EF7 y variables promedio de la CM, TRHr y TRHds, relacionadas con la abundancia de protistas y metazoos.....	169
Tabla 4.20. Coeficientes de correlación de Spearman de la rutina BIO-ENV de las variables promedio y posición del OD, relacionados con la abundancia de protistas y metazoos.....	172
Tabla 4.21. Prueba de Kruskal-Wallis de las variables ambientales, según el factor biorreactor y estacional.....	174
Tabla 4.22. ANOSIM cruzado (biorreactor x estacional), PERMANOVA (biorreactor) y PERMANOVA (estacional) a partir de las variables ambientales.....	177
Tabla 4.23. Resultados de la validación cruzada de la rutina CAP a partir de las variables ambientales, según el factor estacional.....	178
Tabla 4.24. Resultados de la validación cruzada de la rutina CAP a partir de las variables ambientales, según el factor biorreactor.....	179
Tabla 4.25. Resultados del PCA de la matriz total del conjunto de biorreactores a partir de las variables ambientales.....	180
Tabla 4.26. Variables ambientales seleccionadas en la rutina BVSTEP y coeficientes de correlación por tipología de variable y en cada uno de los biorreactores y matriz total, a partir de la abundancia de protistas y metazoos.....	182
Tabla 4.27. Variables ambientales seleccionadas en la rutina BVSTEP y coeficientes de correlación sin categorizar variables y en cada uno de los biorreactores y matriz total, a partir de la abundancia de protistas y metazoos.....	183

Tabla 4.28. Test secuencial, procedimientos y criterios empleados en la rutina DISTLM por tipología de variable ambiental y en cada uno de los biorreactores y la matriz total, a partir de la abundancia de protistas y metazoos.....	185
Tabla 4.29. Test secuencial, procedimientos y criterios empleados en la rutina DISTLM del total de variables ambientales y en cada uno de los biorreactores y la matriz total, a partir de la abundancia de protistas y metazoos.....	187
Tabla 4.30. Porcentaje de variación explicada de la abundancia de protistas y metazoos por los ejes individuales en la rutina DISTLM, a partir de las variables ambientales categorizadas de los distintos biorreactores y la matriz total.....	188
Tabla 4.31. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables OPE y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbrDA en QB.....	189
Tabla 4.32. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables OPE y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbrDA en CX.....	191
Tabla 4.33. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables OPE y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbrDA en CT1 y CT2.....	192
Tabla 4.34. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables OPE y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbrDA en DN.....	193
Tabla 4.35. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables OPE y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbrDA en la matriz total.....	195
Tabla 4.36. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQLM y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbrDA en QB.....	196
Tabla 4.37. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQLM y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbrDA en CX.....	198
Tabla 4.38. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQLM y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbrDA en CT1 y CT2.....	199
Tabla 4.39. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQLM y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbrDA en la matriz total.....	202
Tabla 4.40. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQAF y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbrDA en QB.....	203
Tabla 4.41. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQAF y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbrDA en CXCD.....	204
Tabla 4.42. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQAF y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbrDA en CT2.....	205
Tabla 4.43. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQAF y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbrDA en la matriz total.....	207
Tabla 4.44. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables OPE, FQLM y FQAF, y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbrDA en la matriz total.....	208
Tabla 4.45. Resultados de la rutina DCA a partir de la densidad de protistas y metazoos.....	210
Tabla 4.46. Resultados del CCA entre las variables OPE y protistas y metazoos en CX.....	211
Tabla 4.47. Resultados del CCA entre variables OPE y protistas y metazoos en CT1.....	212
Tabla 4.48. Resultados del CCA entre variables OPE y protistas y metazoos en la matriz total.....	214
Tabla 4.49. Resultados del CCA entre las variables FQLM y protistas y metazoos en CX.....	215
Tabla 4.50. Resultados del CCA entre las variables FQLM y protistas y metazoos en la matriz total..	217

Tabla 4.51. Resultados del CCA entre las variables FQAF y protistas y metazoos en CX.....	219
Tabla 4.52. Resultados del CCA entre las variables FQAF y protistas y metazoos en CT1.....	220
Tabla 4.53. Resultados del CCA entre las variables FQAF y protistas y metazoos en la matriz total..	222
Tabla 4.54. ANOSIM cruzado de 2 vías a partir de las abundancias absolutas de bacterias filamentosas, según el factor biorreactor-estacional.....	229
Tabla 4.55. Resultados de la validación cruzada de la rutina CAP a partir de la densidad absoluta de bacterias filamentosas, según el factor estacional.....	230
Tabla 4.56. Resultados de la validación cruzada de la rutina CAP a partir de la densidad absoluta de bacterias filamentosas, según el factor biorreactor.....	231
Tabla 4.57. Coeficientes de correlación de Spearman (BIO-ENV) de las variables promedio de la EF, CM, TRHr y TRHds, relacionadas con la abundancia de bacterias filamentosas.....	233
Tabla 4.58. Coeficientes de correlación de Spearman de la rutina BIO-ENV de las variables promedio y posición del OD, relacionadas con la abundancia de bacterias filamentosas.....	233
Tabla 4.59. Variables ambientales seleccionadas en la rutina BVSTEP y coeficientes de correlación por tipología de variable y en cada uno de los biorreactores y matriz total, a partir de la abundancia de bacterias filamentosas.....	235
Tabla 4.60. Variables ambientales seleccionadas en la rutina BVSTEP y coeficientes de correlación sin categorizar variables y en cada uno de los biorreactores y matriz total, a partir de la abundancia de bacterias filamentosas.....	236
Tabla 4.61. Test secuencial, procedimientos y criterios empleados en la rutina DISTLM por tipología de variable ambiental y en cada uno de los biorreactores y la matriz total, a partir de la abundancia de bacterias filamentosas.....	238
Tabla 4.62. Test secuencial, procedimientos y criterios empleados en la rutina DISTLM del total de variables ambientales y en cada uno de los biorreactores y la matriz total, a partir de la abundancia de bacterias filamentosas.....	239
Tabla 4.63. Porcentaje de variación explicada de la abundancia de bacterias filamentosas por los ejes individuales en la rutina DISTLM, a partir de las variables ambientales categorizadas de los distintos biorreactores y la matriz total.....	240
Tabla 4.64. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables OPE y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dbrDA en QB.....	241
Tabla 4.65. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables OPE y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dbrDA en CX.....	243
Tabla 4.66. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables OPE y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dbrDA en CT.....	244
Tabla 4.67. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables OPE y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dbrDA en DN.....	245
Tabla 4.68. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables OPE y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dbrDA en la matriz total.....	246
Tabla 4.69. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQLM y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dbrDA en el biorreactor QB.....	248
Tabla 4.70. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQLM y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dbrDA en la EDAR CX.....	241

Tabla 4.71. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQLM y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dBRDA en la EDAR CT.....	251
Tabla 4.72. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQLM y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dBRDA en el biorreactor DN.....	252
Tabla 4.73. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQLM y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dBRDA en la matriz total.....	253
Tabla 4.74. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQAF y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dBRDA en el biorreactor QB.....	254
Tabla 4.75. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQAF y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dBRDA en la EDAR CX.....	255
Tabla 4.76. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQAF y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dBRDA en el biorreactor CT1.....	256
Tabla 4.77. Resultados de la rutina DCA a partir de la densidad de bacterias filamentosas.....	257
Tabla 4.78. Test secuencial, procedimientos y criterios empleados en la rutina DISTLM de los componentes del nitrógeno y en cada uno de los biorreactores y la matriz total, a partir de la abundancia de bacterias filamentosas.....	258
Tabla 4.79. Porcentaje de variación explicada de la abundancia de bacterias filamentosas por los ejes individuales en la rutina DISTLM, a partir de los componentes del nitrógeno de los distintos biorreactores y la matriz total.....	259
Tabla 4.80. Coeficientes de correlación múltiple parcial de los componentes del nitrógeno y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dBRDA en QB.....	259
Tabla 4.81. Coeficientes de correlación múltiple parcial de los componentes del nitrógeno y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dBRDA en CX.....	261
Tabla 4.82. Coeficientes de correlación múltiple parcial de los componentes del nitrógeno y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas <i>N. limicola</i> con los ejes del dBRDA.....	262
Tabla 4.83. Coeficientes de correlación múltiple parcial de los componentes del nitrógeno y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dBRDA en la matriz total.....	263

CAPITULO VIII.- ANEXO

Tabla 8.1. Media, desviación estándar y rango de la abundancia absoluta de protistas, metazoos y grupos en los biorreactores.....	445
Tabla 8.2. Media, desviación estándar y rango de la abundancia absoluta de protistas, metazoos y grupos en la matriz total.....	448
Tabla 8.3. Media, desviación estándar y rango de las variables fisicoquímicas medidas en el afluente, efluente y rendimientos en los biorreactores.....	449
Tabla 8.4. Media, desviación estándar y rango de las variables fisicoquímicas en el afluente, efluente y rendimientos de la matriz total.....	451
Tabla 8.5. Media, desviación estándar y rango de las variables fisicoquímicas del licor mezcla.....	452
Tabla 8.6. Media, desviación estándar y rango de las variables fisicoquímicas medidas en el afluente.	453
Tabla 8.7. Media, desviación estándar y rango de las variables operacionales.....	454
Tabla 8.8. Rango del IF de las bacterias filamentosas identificadas en los biorreactores mediante la técnica FISH y microscopía convencional.....	458

Tabla 8.9. Densidad absoluta (ind/mL) de protistas y metazoos en los muestreos de los biorreactores QB, CXAB, CXCD, DN, CT1 y CT2.....	472
Tabla 8.10. Densidad absoluta (ind/mL) de los grupos de protistas y metazoos en los muestreos de los biorreactores QB, CXAB, CXCD, DN, CT1 y CT2.....	475
Tabla 8.11. Densidad absoluta (IF) de microorganismos filamentosos en los muestreos de los biorreactores QB, CXAB, CXCD, DN, CT1 y CT2.....	477
Tabla 8.12. Valores de las variables ambientales en los muestreos de los biorreactores QB, CXAB, CXCD, DN, CT1 y CT2.....	480
Tabla 8.13. Valores de los componentes del nitrógeno en los muestreos de los biorreactores QB, CXAB, CXCD, DN, CT1 y CT2.....	483

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia de la depuración de las aguas residuales

La contaminación es, según la ley 29/1985 de 2 de agosto de aguas; “*la acción y el efecto de introducir materias o formas de energía, o inducir condiciones en el agua que, de modo directo o indirecto, impliquen una alteración perjudicial de su calidad en relación con sus usos posteriores o con su función ecológica*”. La contaminación de las aguas es uno de los factores más importantes que puede romper el equilibrio entre el hombre y su entorno tanto a corto, como a medio y largo plazo, siendo la prevención y lucha contra aquella una necesidad prioritaria (Hernández *et al.*, 1996).

El hombre utiliza el agua no solo para su consumo, sino también para su actividad y su confort, lo que unido al desarrollo urbanístico ha generado un enorme volumen de aguas de desecho. De aquí surge la denominación de aguas residuales. Por lo tanto, las aguas residuales son aquellas que han sido utilizadas en actividades domésticas y urbanas, industria o agricultura.

Las aguas residuales de origen doméstico tienen una composición muy variada debido a la diversidad de factores que la afectan y a la naturaleza de la población residente (Mujeriego, 1990). La principal fuente de contaminación en el agua que fluye por las alcantarillas en las ciudades tiene su origen en los excrementos humanos y animales (heces y orina), y en menor proporción en las aguas resultantes del lavado de ropa, preparación de alimentos y duchas. Por otra parte, las aguas pluviales o de lavado de calles, que drenan desde las zonas urbanas, aportan también una carga contaminante debida al arrastre de materia sólida inorgánica en suspensión y materia orgánica soluble e insoluble. Las aguas residuales han llegado a constituir un serio problema ambiental, no solo por el hecho de verter estas aguas contaminadas al medio acuático con el consiguiente deterioro ecológico del mismo, sino también por su escaso aprovechamiento posterior, ocasionando una pérdida energética y económica. El progresivo aumento de vertidos en las últimas décadas ha originado un deterioro en la calidad de las aguas de los medios acuáticos, sobrepasando la capacidad de autodepuración de los mismos. A esta situación ha contribuido de manera importante el creciente desarrollo industrial, las actividades agrícolas, así como la concentración de la población en grandes núcleos urbanos, especialmente en las zonas costeras.

La eutrofización es un proceso biológico que se produce de manera natural en el medio y que se puede definir como el incremento progresivo de productores primarios (cianobacterias y algas principalmente) debido a alteraciones en los factores que limitan su crecimiento: temperatura, luz y nutrientes. El vertido de agua residual en ecosistemas acuáticos con alto contenido en nutrientes, principalmente nitrógeno en forma de nitrato, nitrito o amonio y fósforo en forma de ortofosfato, provoca una aceleración de este proceso, originando una serie de cambios perjudiciales para los ecosistemas, los cuales se detallan a continuación (Martín, 2005):

- Aumento de la turbidez en la superficie debido al crecimiento masivo del fitoplancton. La disminución de la transparencia provoca una menor penetración de la luz en la columna de agua y la posible desaparición de la vegetación de fondo por falta de radiación solar.
- Aumento de la toxicidad del agua debido a la producción de sustancias tóxicas por parte de algunas especies de fitoplancton. Esto puede ocasionar graves consecuencias sobre la fauna piscícola, fauna terrestre que se abastece de esas aguas y abastecimientos de poblaciones a partir de embalses eutrofizados.
- Disminución de la biodiversidad en general, tanto de especies de fitoplancton como de organismos superiores. Se produce una simplificación notable de los ecosistemas, haciendo a estos más vulnerables a posibles perturbaciones futuras.
- Fluctuaciones notables en las concentraciones de oxígeno disuelto en el agua; altas durante el día y bajas por la noche debido al balance entre fotosíntesis y respiración del fitoplancton.
- Aumento notable del pH debido a la alta tasa de consumo de CO₂ por parte del fitoplancton.

1.2 Legislación

Han sido varias las iniciativas legislativas comunitarias relacionadas con la protección del medio respecto a la problemática de la eutrofización y la gestión más eficiente del agua:

- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo, cuyo objetivo es proteger el estado ecológico de las masas de agua continentales, aguas de transición, aguas costeras y aguas subterráneas.
- Directiva 91/271/CEE (publicada en el D.C.C.E el 20 de mayo de 1991), modificada por la Directiva 98/15/CE, en la que se establece la obligación de disponer de sistemas colectores y de tratar las aguas residuales urbanas (ARU) e industriales (ARI), así como los límites de vertido de los contaminantes procedentes de las instalaciones de depuración. Esta directiva introduce el concepto de zona sensible a la eutrofización haciendo referencia a la importancia de eliminar nutrientes, especialmente nitrógeno y fósforo.
- Directiva 91/676/CEE para la protección de las aguas contra la contaminación producida por nitratos procedentes de fuentes agrícolas.

La normativa aplicable para el control del vertido de las aguas residuales en España viene recogida en el Real Decreto 509/1996 (modificado posteriormente por el RD 2116/98), de desarrollo del RD-Ley 11/1995 y que a su vez incorpora la Directiva 91/271/CEE. En este Real Decreto se impone la aplicación de tratamientos a las ARU antes

de su vertido a las aguas continentales o marítimas, obligando a cumplir los valores de concentración o porcentajes de reducción de contaminantes en función de los habitantes equivalentes (h.e) (tabla 1.1). Para ello, las aguas residuales producidas diariamente deberán ser recolectadas, transportadas y tratadas, siendo necesario toda una infraestructura compuesta de alcantarillas y colectores, además de la implantación de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR). Las aguas tratadas deben cumplir los criterios de calidad según la clasificación de los puntos de vertido en "zonas sensibles" y "zonas menos sensibles", así como los límites máximos admisibles de los diferentes parámetros en las aguas depuradas vertidas.

Tabla 1.1. Límites máximos admisibles en el vertido del agua residual.			
Parámetro	Aplicable	Concentración	% reducción
Demanda biológica de oxígeno (DBO ₅), a 20 °C, sin nitrificación	Siempre	25 mg O ₂ /L	70-90%
Demanda química de oxígeno (DQO)	Siempre	125 mg O ₂ /L	75%
Sólidos en suspensión totales (SST)	Siempre	35 mg/L (más de 10 000 h.e)	90%
		60 mg/L (2000-10 000 h.e)	70%
Nitrógeno total (NT)	Zona sensible	1 mg/L (más de 100 000 h.e)	80%
		2 mg/L (10 000-100 000 h.e)	
Fósforo total (PT)	Zona sensible	10 mg/L (más de 100 000 h.e)	70-80%
		15 mg/L (10 000-100 000 h.e)	

1.3 Depuración biológica de las aguas residuales

Los principales objetivos del tratamiento biológico de las aguas residuales son:

- La eliminación de los sólidos suspendidos coloidales mediante procesos de adsorción en la matriz polimérica del flóculo del fango activo.
- La estabilización de la materia orgánica disuelta a través de los microorganismos, principalmente bacterias.
- La eliminación de contaminantes orgánicos e inorgánicos.
- La eliminación de microorganismos patógenos de transmisión fecal.

1.3.1 Clasificación de los tratamientos biológicos

Los procesos biológicos aplicados al tratamiento de las aguas residuales se pueden dividir en varios tipos, dependiendo si el tratamiento se lleva a cabo en sistemas de cultivo en suspensión, en soporte fijo o combinación de ambos (Tchobanoglous *et al.*, 2003).

Procesos de tratamiento de cultivo en suspensión: el proceso de fangos activos

El proceso de fangos activos es el sistema de tratamiento biológico más habitual en la depuración de las aguas residuales urbanas e industriales asimilables a urbanas. Fue desarrollado en Inglaterra en 1914 por Arden & Lockett, quienes realizaron experimentos con un cultivo biológico en suspensión en un tanque aireado e introdujeron la idea de recircular la biomasa suspendida formada durante la aireación. Esta suspensión fue llamada fango activo y correspondía a la biomasa activa responsable del proceso de depuración. Inmediatamente después de la publicación de su primer trabajo, comenzaron a desarrollarse instalaciones a gran escala en Inglaterra y en Estados Unidos.

Los primeros reactores de fangos activos fueron operados en régimen discontinuo, como una unidad de "llenado-vaciado". Sin embargo, la necesidad de tratar grandes caudales de aguas residuales y los problemas de control de estas unidades (grandes descargas de caudal frente al caudal afluente, obstrucción de los difusores de aireación durante la sedimentación, operación manual del ciclo cuando no se disponía de automatización), obligaron rápidamente a su transformación en reactores de flujo en continuo, abandonándose el uso generalizado de estos durante cerca de cincuenta años (Droste, 1997).

Normalmente, la configuración básica del proceso de fangos activos consta de un reactor donde se mantiene en suspensión un cultivo microbiano capaz de asimilar la materia orgánica y otros contaminantes presentes en el agua residual a depurar. El proceso requiere de un sistema de aireación y agitación que suministre el oxígeno demandado por los microorganismos encargados de la depuración, evite la sedimentación de los flóculos en el reactor y permita la homogeneización del fango activo o licor mezcla. Al cabo de un período de tiempo determinado, y una vez que el sustrato ha sido suficientemente oxidado, el licor mezcla se envía a un tanque de sedimentación, denominado decantador secundario, donde se separa del agua depurada (figura 1.1). Una parte de la biomasa decantada se recircula al reactor para mantener una concentración de microorganismos adecuada, mientras que el resto del fango se extrae del sistema para evitar una acumulación excesiva de la biomasa, controlando de esta manera el tiempo medio de retención celular.

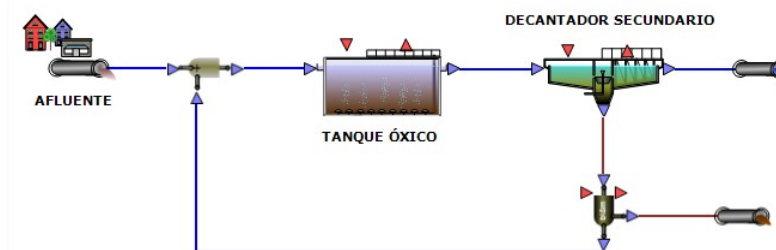


Figura 1.1. Esquema básico del proceso de fangos activos. Fuente: software WEST.

El proceso de fangos activos ha sido desarrollado principalmente para la eliminación de la materia orgánica y de los nutrientes (nitrógeno y fósforo), alternando etapas aerobias, anóxicas y anaerobias. Los microorganismos, principalmente bacterias, convierten la materia orgánica y los nutrientes en compuestos más simples, así como en nueva biomasa.

Aunque no son objeto del presente trabajo, existen otros procesos de cultivo en suspensión con microorganismos anaerobios formando gránulos, entre ellos; el sistema UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) o también conocido como RAFA (reactor anaerobio de flujo ascendente). Se trata de un tipo de biorreactor que opera en régimen continuo y en flujo ascendente, es decir, el afluente entra por la parte inferior del reactor, atraviesa todo el perfil longitudinal y sale por la parte superior. Estos sistemas anaerobios son adecuados principalmente cuando el afluente presenta altas cargas orgánicas, como por ejemplo los procedentes de aguas residuales industriales del sector agroalimentario.

Procesos de tratamiento de cultivo fijo o soporte sólido

La principal característica de este tipo de procesos se basa en la utilización de un material inerte que actúa como soporte sobre el que se adhieren los microorganismos formando una biopelícula. El soporte puede encontrarse fijo en un reactor, en el que el agua residual fluye progresivamente a través del mismo de forma vertical, o puede girar alrededor de un eje moviéndose dentro del agua afluente. Esto da lugar a los dos tipos fundamentales de tratamientos mediante cultivo fijo: filtros percoladores y contactores biológicos rotatorios (CBR).

1.3.2 Procesos bioquímicos

Los procesos bioquímicos que tienen lugar en el tratamiento de las ARU se basan en una serie de reacciones llevadas a cabo principalmente por distintas poblaciones de bacterias. Los procesos metabólicos que contribuyen a la eliminación de contaminantes pueden llevarse a cabo intra o extracelularmente (actividad exoenzimática). Las reacciones extracelulares permiten la ruptura de compuestos orgánicos complejos en otros más simples que pueden ser utilizados por un mayor número de bacterias. Las reacciones del metabolismo celular permiten la obtención de energía y poder reductor (catabolismo) y la síntesis de nuevos compuestos y material celular (anabolismo). Las reacciones catabólicas implican una transferencia de electrones desde un compuesto donador hasta un aceptor terminal de electrones, y por lo tanto, la oxidación total o parcial de los compuestos donadores. Las poblaciones de bacterias heterótrofas son aquellas que utilizan los compuestos orgánicos como donadores de electrones para la obtención de energía. Por otro lado, los organismos autótrofos pueden utilizar fuentes de carbono inorgánico para la síntesis de compuestos orgánicos, en estos casos la fuente de energía y los donadores de electrones pueden ser la luz o compuestos inorgánicos u orgánicos.

A continuación se presentan los principales procesos bioquímicos que tienen lugar en una EDAR.

Bioquímica del proceso de eliminación de la materia orgánica

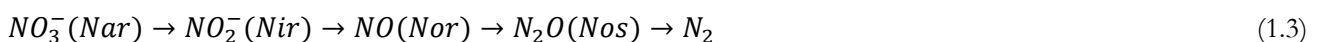
La materia orgánica presente en el agua residual se encuentra constituida principalmente por carbohidratos, proteínas, lípidos o en su forma hidrolizada, azúcares, aminoácidos y ácidos grasos de cadena larga. Mientras que los azúcares, aminoácidos y ácidos grasos de cadena larga son utilizados directamente por las bacterias quimiorganotrofas como fuente de energía, la oxidación de carbohidratos, proteínas y lípidos requiere de una hidrólisis previa mediante la cual se produce una hidrólisis enzimática de la materia orgánica particulada. Este es un proceso lento y se considera muchas veces como el paso limitante en la degradación de la materia orgánica.

En la biodegradación de la materia orgánica, las reacciones bioquímicas que tienen lugar dependen del compuesto que actúe como aceptor terminal de electrones, y como consecuencia, de las estrategias metabólicas seguidas por las bacterias (Gijzen, 2001). Si la biodegradación se da en condiciones aerobias, donde el oxígeno actúa como aceptor de electrones en un proceso de respiración aeróbica, la materia orgánica queda totalmente oxidada obteniendo como productos finales dióxido de carbono y agua. Sin embargo, en condiciones anaerobias también pueden darse transformaciones de respiración anaeróbica y fermentación.

En el caso de los aminoácidos, estos sufren además procesos de desaminación o amonificación, a partir de la cual su contenido en nitrógeno en forma de grupo amina queda liberado al medio en forma de amoníaco y amonio (Sawyer *et al.*, 1994). A modo de ejemplo, las siguientes reacciones muestran la oxidación de la materia orgánica (expresada como glucosa).



Contrariamente, las condiciones anóxicas se caracterizan por la ausencia de oxígeno molecular, donde compuestos como nitritos (NO_2^-) o nitratos (NO_3^-) pueden actuar como aceptores terminales de electrones. En estas condiciones, los nitratos y nitritos se reducen a nitrógeno molecular (N_2), en el proceso denominado desnitrificación. En esta respiración anaeróbica, el proceso se encuentra catalizado por cuatro tipos de nitrógeno reductasas: nitrato reductasa (Nar), nitrito reductasa (Nir), óxido nítrico reductasa (Nor), óxido nitroso reductasa (Nos) (Zumft, 1997).

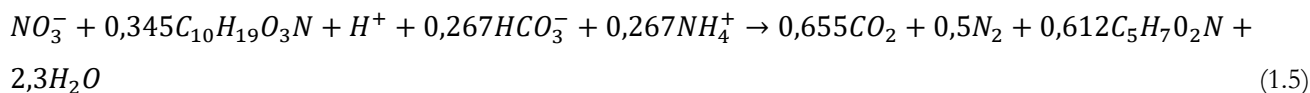


La producción energética, en forma de adenosin trifosfato (ATP), a partir del nitrito y nitrato es menor que la obtenida a partir del oxígeno, y mayor que la obtenida a partir de la reducción del sulfato, situación que condiciona la preferencia por parte de las bacterias heterótrofas desnitrificantes de emplear un aceptor de electrones u otro (Madigan *et al.*, 2009). En presencia de oxígeno, los microorganismos facultativos tendrán preferencia hacia este frente al nitrito y nitrato, mientras que en ausencia de oxígeno los microorganismos tendrán preferencia sobre el nitrito y el nitrato antes que sobre el sulfato disponible.

En la reacción general de desnitrificación, utilizando metanol como fuente de carbono orgánico; 1,9 g de CH₃OH (2,86 g expresado como DQO) se consumen para reducir 1 g de N-NO₃⁻.



Si se considera la síntesis de las bacterias implicadas (C₅H₇NO₂), la reacción global sería la siguiente:



El proceso de desnitrificación contribuye a incrementar el pH debido al incremento de la alcalinidad. Por cada mg de N-NO₃⁻ reducido se generan 3,57 mg de alcalinidad, expresada en forma de CaCO₃. Gracias a dicho incremento durante el proceso de desnitrificación se compensa el descenso del pH que se produce durante el proceso aeróbico de nitrificación, siendo principalmente relevante en afluentes con baja alcalinidad.

Bioquímica del proceso de nitrificación

El nitrógeno presente en las aguas residuales urbanas generalmente se encuentra en forma de amonio, urea, ácido úrico, proteínas, azúcares aminados y aminas, entre otros. Gracias a la acción bacteriana, el nitrógeno orgánico es transformado a ión amonio. Como consecuencia de la actividad de los microorganismos proteolíticos las proteínas son degradadas hasta aminoácidos, y a su vez la degradación de los aminoácidos para formar nitrógeno amoniacal es realizada por los organismos amonificantes (Catalán, 1997). En disolución acuosa dicho compuesto puede estar en forma de amoniaco (NH₃) o en su forma ionizada (NH₄⁺), siendo esta última la forma predominante en las aguas residuales debido al pH característico de las mismas.

El compuesto orgánico con más nitrógeno es la urea, la cual es hidrolizada por la enzima ureasa a amoniaco y anhídrido carbónico, por lo tanto, la liberación del amoniaco se produce antes de llegar las aguas residuales a la

EDAR (Catalán, 1997). Cuando un organismo muere, el nitrógeno de los aminoácidos se transforma en amoníaco a través del proceso de amonificación:



Este proceso reintroduce el amoníaco o el ión amonio en el ciclo del nitrógeno. El amonio es transformado en nitrito y este en nitrato mediante el proceso de nitrificación. Los iones nitrito y nitrato son convertidos a N_2 o N_2O mediante la acción de las bacterias desnitrificantes (Catalán, 1997).

Las transformaciones que tienen lugar en el proceso de nitrificación-desnitrificación vía nitrato en las EDAR se encuentran representadas en la figura 1.2.

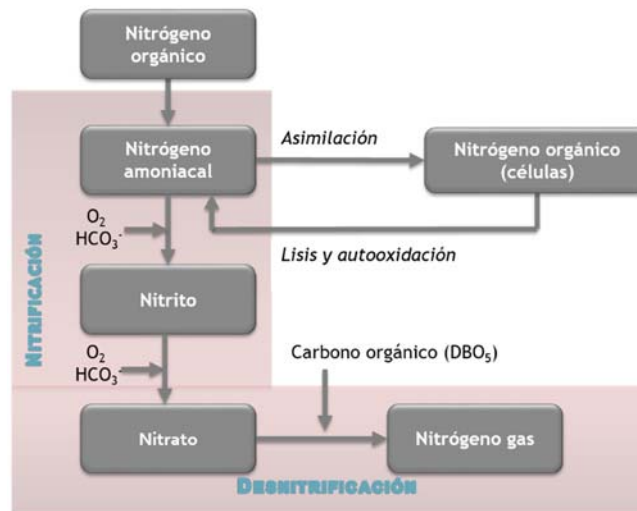


Figura 1.2. Transformaciones del nitrógeno en el proceso de nitrificación-desnitrificación vía nitrato. Fuente: Elaboración propia.

Debido a la importancia que ha adquirido la eliminación del nitrógeno en las corrientes de agua residual, la nitrificación en las EDAR se ha convertido en uno de los procesos clave en la depuración. En las instalaciones, el nitrógeno es eliminado por diferentes vías. En primer lugar, el amonio es asimilado para la síntesis de material celular, estimándose un consumo de nitrógeno para el crecimiento de la biomasa en los sistemas de fangos activos entre 10-30%. La decantación primaria puede llegar a eliminar entre un 5-10% del nitrógeno en forma de nitrógeno particulado, aunque estos porcentajes de eliminación siguen siendo insuficientes para el cumplimiento de los requisitos del vertido. Por ello, se aplican otros procesos para aumentar el grado de eliminación. Dentro de estos

procesos, que pueden ser tanto fisicoquímicos como biológicos, destaca el proceso biológico de nitrificación seguido del proceso de desnitrificación vía nitrato, anteriormente descrito. Este primer proceso biológico, que consiste en la oxidación secuencial aeróbica de amonio a nitrito y de nitrito a nitrato, depende de la presencia de poblaciones de bacterias nitrificantes quimiolitotóxicas encargadas de catalizar dicha transformación: las bacterias oxidantes de amonio (BOA) y las bacterias oxidantes del nitrito (BON).

En el primer paso del proceso, las BOA transforman el amonio a nitrito. Para ello son necesarias dos enzimas encargadas de catalizar el proceso: la amonio monooxigenasa (Hollocher *et al.*, 1981), que es la responsable de la oxidación del amonio a hidroxilamina, y la oxidoreductasa hidroxilamina (Olson & Hooper, 1983), que controla la oxidación de la hidroxilamina a nitrito. La reacción global es la siguiente:



El nitrito es posteriormente oxidado a nitrato por las BON (Bock *et al.*, 1992). Esta reacción es catalizada por la enzima nitrito oxidoreductasa (Bock & Wagner, 2001) para el género *Nitrobacter*, mientras que para el resto de BON es catalizada por la enzima denominada sistema nitrito-oxidante, siendo la reacción global la siguiente:



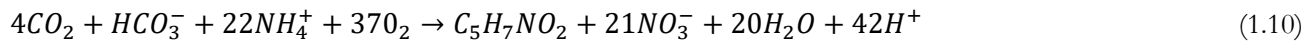
La reacción global del proceso de nitrificación viene dada por la siguiente expresión:



En el balance total de la reacción se produce energía, que es utilizada por los microorganismos para sus funciones de crecimiento y mantenimiento celular. Si consideramos la fórmula química de la biomasa como $C_5H_7NO_2$, esta reacción puede expresarse como:



La ecuación global del proceso de nitrificación quedaría expresada de la siguiente manera:



Tal y como podemos observar en la reacción global del proceso, la oxidación del amonio requiere el consumo de CO_2 del medio y produce H^+ , lo que conlleva un consumo de alcalinidad del medio. Por último, indicar que en condiciones anaerobias, la oxidación del NH_4^+ a N_2 puede darse a través de un proceso denominado “Anammox”, donde los NO_2^- actúan como aceptores terminales de electrones (Hao *et al.*, 2002).

La ecuación de oxidación-reducción se muestra a continuación:



Las poblaciones de bacterias que llevan a cabo este proceso fueron identificadas por primera vez por Mulder *et al.* (1995) y la especie se denominó *Brocadia anammoxidans*. En la actualidad se han detectado otras poblaciones capaces de llevar a cabo esta oxidación (*Scalindua brodae* y *Scalindua wagneri*). Las poblaciones de bacterias conocidas comúnmente como bacterias anammox requieren condiciones estrictamente anaerobias y se caracterizan por obtener rendimientos en la obtención de materia celular muy inferiores a otras poblaciones de bacterias.

Bioquímica del proceso de eliminación biológica del fósforo

En las aguas residuales es posible encontrar el fósforo en distintas formas:

- *Ortofosfatos* (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , $H_2PO_4^-$, H_3PO_4). Su concentración se encuentra normalmente en las aguas residuales entre 3 y 7 mg P/L. Dichos compuestos pertenecen a la fracción inorgánica del fósforo, siendo fácilmente asimilables por la biomasa. La fracción de cada especie química vendrá determinada por el pH del agua residual.
- *Polifosfatos* $(PO_3^{3-})_n$. Se trata de polímeros formados por monómeros con moléculas de fosfato. Se encuentran almacenados dentro de las células, para posteriormente ser degradados a ortofosfatos.
- *Fósforo precipitado*. Fracción de ortofosfatos que forma precipitados con metales. Esta fracción suele ser importante en el reactor biológico, principalmente en condiciones anaerobias.
- *Fósforo orgánico*. Fracción de fósforo asociada a la materia orgánica. Su concentración suele encontrarse entre 1-3 mg P/L. Este se encuentre formando parte de los ácidos nucleicos, los fosfolípidos y el ATP.

El fósforo puede ser eliminado de las aguas residuales mediante un proceso de fangos activos que alterne etapas aerobias y anaerobias (figura 1.3). Durante este proceso, conocido como EBPR (*enhanced biological phosphorus removal*), el agua residual afluyente al reactor entra en la zona anaerobia, donde las bacterias acumuladoras de polifosfatos (PAOs, *polyphosphate accumulating organisms*) toman los ácidos grasos volátiles (AGV) de cadena corta muy rápidamente. Estos no son utilizados para aumentar la velocidad de crecimiento de las bacterias, siendo almacenados en forma de poli- β -hidroxialcanoatos (PHA). La composición de dichos compuestos va a depender de la fuente de carbono asimilada, de forma que si es acetato, se sintetizará poli- β -hidroxibutirato (PHB), si es propionato, el compuesto sintetizado mayoritariamente será poli- β -hidroxivalerato (PHV). Durante la etapa anaerobia, los niveles de PHA aumentan paralelamente a la asimilación de los AGV, mientras el contenido intracelular de polifosfatos disminuye a la vez que aumentan los niveles de fosfatos en el medio. La síntesis de PHA se realiza utilizando los polifosfatos almacenados como fuente de energía. Al mismo tiempo, el glucógeno almacenado intracelularmente es metabolizado por medio de la glucólisis para la producción de ATP y poder reductor (NADH) (Blackall *et al.*, 2002).

En la fase aerobia, los fosfatos del medio son tomados por las PAOs y almacenados intracelularmente en forma de polifosfatos, pudiendo ser mayor del 15% en peso seco de la célula. El PHA almacenado en la fase anaerobia es utilizado en esta fase para el crecimiento de las bacterias, como fuente de energía para la asimilación de fosfatos del medio y como fuente de carbono para la regeneración de glucógeno intracelular. De esta forma, se obtiene un efluente tratado con bajo contenido en fósforo y un fango activo con grandes cantidades del mismo almacenado intracelularmente, debido a que se captura y almacena cantidades superiores a las necesarias para la síntesis celular (Serafim *et al.*, 2002).

La actividad de las PAOs se da en condiciones mesófilas y presenta cierta sensibilidad ante variaciones del pH, tanto en la liberación de fosfatos, como en su crecimiento en condiciones aerobias y anóxicas. Así, aunque la velocidad a la que se da la liberación de fosfatos a partir de la captación de los AGV no se encuentra alterada ante variaciones de pH, la relación fósforo liberado/AGV captado varía desde 0,24 hasta 0,73 g P/g DQO entre valores de pH de 5,5 hasta 8,5 (Smolders *et al.*, 1995). Por otro lado, se ha observado que valores de pH superiores o inferiores a un valor óptimo de 7,4 provocan una disminución en el crecimiento y captación de ortofosfatos por parte de las PAO (Filipe *et al.*, 2001).

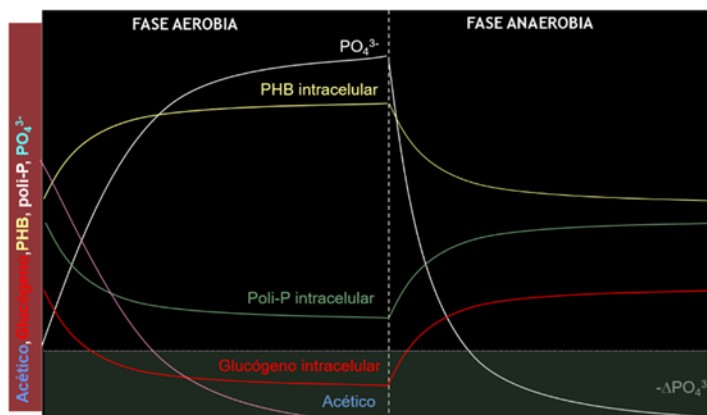


Figura 1.3. Esquema de eliminación biológica del fósforo. Fuente: Borrás (2008).

Existen bacterias competidoras de las PAOs, las cuales poseen un metabolismo muy similar, ya que utilizan los AGV para la producción de PHA en la zona anaerobia y sintetizan glucógeno en la zona aerobia. Sin embargo, no son capaces de eliminar fósforo del medio, produciéndose así una competencia por el sustrato (AGV) entre ambas comunidades bacterianas. Por ello, estas bacterias han sido descritas como responsables del deterioro de los procesos EBPR. A estas bacterias se les ha llamado organismos acumuladores de glucógeno (GAOs, *glycogen accumulating organisms*) o G-bacterias.

1.3.3 Principales estrategias empleadas en la eliminación biológica de materia orgánica y nutrientes

El agua residual afluyente a la EDAR reduce su carga contaminante y los fangos que se originan se estabilizan a partir de una serie de tratamientos físicos, químicos y procesos bioquímicos (resumidos anteriormente). Las etapas de tratamiento más frecuentes que suelen encontrarse en las EDAR son el pretratamiento, tratamiento primario y secundario, el tratamiento de los fangos producidos y ocasionalmente el tratamiento terciario. Este último consiste en la aplicación de tratamientos físicos, químicos y/o biológicos, a fin de obtener una mejor calidad del agua tratada para cumplir los valores máximos permitidos del vertido.

De forma general, el pretratamiento consta de un sistema de enrejados y tamices para la eliminación de objetos de gran tamaño (trapos, maderas, fibras, etc.) con el objetivo de evitar obstrucciones en los equipos de bombeo, tuberías, así como evitar la acumulación de sólidos inertes en la línea de fangos. Posteriormente, un sistema de desengrasado-desarenado se encarga de la retirada de grasas y arenas (materiales inorgánicos densos) del agua residual afluyente que no puedan ser tratados de forma biológica. Una eliminación deficiente de aceites y grasas puede originar desequilibrios biológicos en el tanque de aireación, mientras que las arenas pueden originar abrasión y

desgaste de equipos mecánicos, obstrucción en tuberías y depósito en decantadores y reactores. Posterior a este tratamiento, algunas instalaciones disponen de tanques de homogeneización con el fin de laminar la carga y/o caudal afluente.

El objetivo principal del tratamiento primario es la separación por medios físicos de los sólidos en suspensión cuando la velocidad ascensional del agua es inferior a la de caída de las partículas, tratándose en este caso de una separación por gravedad a través de un decantador o clarificador. En algunas estaciones depuradoras de aguas residuales industriales (EDARI), principalmente dentro del sector agroalimentario, es común el empleo de la flotación como tratamiento primario. La separación se consigue introduciendo finas burbujas de gas, normalmente aire, en la fase líquida. Las burbujas se adhieren a las partículas y la fuerza ascensional que experimenta el conjunto partícula-burbuja de aire hace que suban hasta la superficie del líquido. De esta forma, es posible hacer ascender a la superficie partículas cuya densidad es mayor que la del líquido, además de favorecer la ascensión de las partículas cuya densidad es inferior, como el caso del aceite en el agua. La principal ventaja del proceso de flotación frente al de sedimentación es que permite eliminar mejor y en menos tiempo las partículas pequeñas o ligeras cuya deposición es lenta. Una vez las partículas se hallan en superficie, pueden ser recogidas mediante un arrastre superficial (Tchobanoglous *et al.*, 2003). También dentro del tratamiento primario se incluyen todos aquellos tratamientos fisicoquímicos, como la coagulación y floculación, que permiten a las partículas coloidales formar flóculos de gran tamaño mejorando su separación.

Todas las etapas de tratamiento previas al tratamiento secundario (biológico) tienen como objetivo común proteger y evitar sobredimensionar este último y favorecer el cumplimiento de su objetivo principal; la eliminación de la materia orgánica y nutrientes (nitrógeno y fósforo), de acuerdo con las restricciones impuestas en el vertido al medio receptor. El tratamiento biológico consiste en potenciar una serie de reacciones de oxidación-reducción a través de una comunidad heterogénea de bacterias presentes en el fango activo, utilizando los contaminantes como fuente de energía y nutrientes para su crecimiento y biosíntesis.

A continuación se presentan algunas de las configuraciones más comunes para la eliminación de materia orgánica, eliminación simultánea de materia orgánica y nitrógeno, así como para la eliminación de materia orgánica, nitrógeno y fósforo.

Eliminación de materia orgánica

El sistema de fangos activos convencional fue creado en un principio para la eliminación de materia orgánica (figura 1.1). Una variante de la configuración convencional es la tecnología de contacto estabilización, propuesta por primera vez por Ullrich & Smith (1951). En esta tecnología se incorpora una zona de reaireación del fango

procedente del decantador secundario. Con esta zona se favorece la respiración endógena del fango activado de forma que este queda estabilizado, regenerándose su capacidad de almacenar materia orgánica en cuanto entre en contacto con el agua residual afluyente.

Eliminación de materia orgánica y nitrógeno

Las tecnologías de fangos activados más utilizadas en la eliminación conjunta de materia orgánica y nitrógeno están constituidas al menos por dos reactores separados, en los que manteniendo condiciones aerobias y anóxicas se dan los procesos de nitrificación y desnitrificación. Esta configuración ha dado lugar a tres esquemas diferentes: Ludzack-Ettinger, Ludzack-Ettinger modificado y Wuhrman.

Ludzack-Ettinger modificado. Dicho sistema de predesnitrificación consta de dos reactores en serie (figura 1.4). En el primero tiene lugar la desnitrificación utilizando el carbono presente en el agua residual afluyente como sustrato (donador de electrones) y los nitratos como aceptores de electrones, degradándose en este la mayor parte de la materia orgánica. El segundo reactor se mantiene en condiciones aerobias y en él se produce principalmente la oxidación del nitrógeno amoniacal a nitrato (nitrificación). La corriente de nitratos (generados en la zona aerobia) a la zona anóxica se denomina recirculación interna, permitiendo de esta forma regular el grado de desnitrificación. Los fangos sedimentados en el decantador secundario son recirculados al reactor anóxico (recirculación externa).

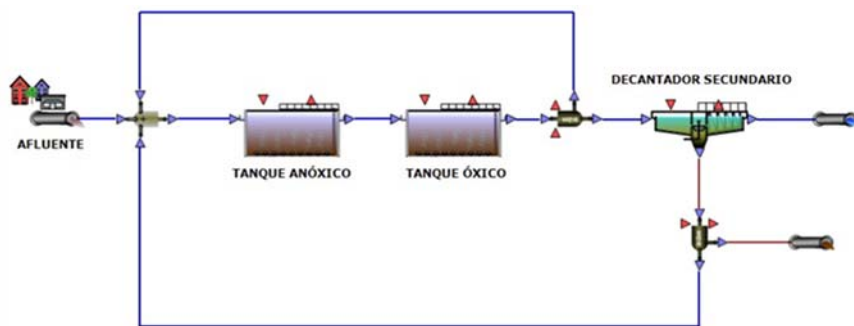


Figura 1.4. Esquema Ludzack-Ettinger modificado. Fuente: software WEST.

Otro de los esquemas similares, en este caso de postdesnitrificación, que no ha tenido la suficiente aceptación es el esquema Wuhrman. El motivo es principalmente debido a la necesidad de adición de una fuente de carbono orgánico para la desnitrificación, obteniéndose como norma general bajos rendimientos en cuanto a la eliminación del nitrógeno.

Esquema Bardenpho. Este proceso es una variación sobre el sistema Ludzack-Ettinger modificado, mediante la incorporación de cuatro etapas en serie alternando zonas anóxicas y aerobias (figura 1.5). El agua afluyente entra en el primer reactor anóxico donde se recircula licor mezcla nitrificado procedente del reactor aerobio que está situado a continuación. Tras el primer reactor aerobio se encuentra el segundo reactor anóxico, donde se completa la desnitrificación utilizando como fuente de carbono la materia orgánica procedente de la respiración endógena de los microorganismos. De esta manera, se consigue un aumento en el rendimiento de la eliminación del nitrógeno oxidado. La etapa de postaireación elimina por arrastre el N_2 formado durante la desnitrificación, mejorando de esta forma la sedimentabilidad del fango en el decantador secundario.

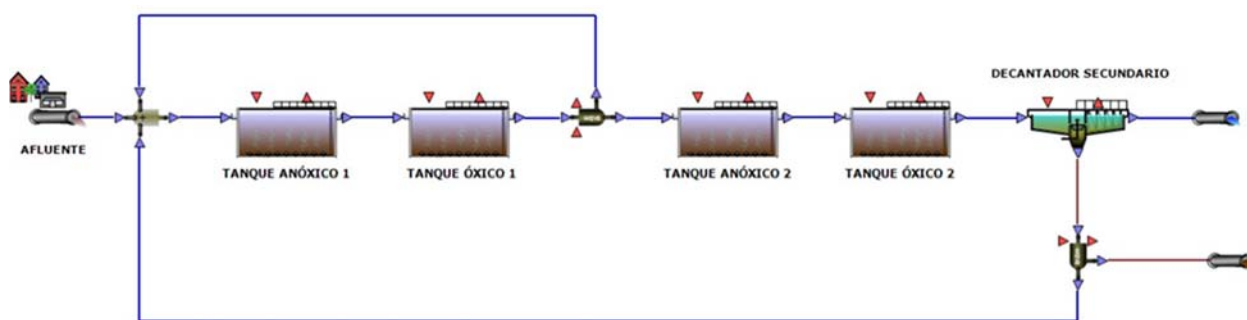


Figura 1.5. Esquema Bardenpho. Fuente: software WEST.

El proceso de contacto-estabilización utilizado para la eliminación de materia orgánica puede ser empleado también en tecnologías de eliminación de materia orgánica y nitrógeno. Así, el proceso RDN (Kos *et al.*, 1992) añade al proceso Ludzack-Ettinger modificado un reactor aerobio a través del cual se hace circular la corriente de recirculación de fangos. Con este proceso se consigue una producción de fangos de buena sedimentabilidad, una eliminación parcial del fósforo, menor volumen de reacción que el proceso Ludzack-Ettinger y una desnitrificación intraflocular en el nuevo reactor aerobio.

Canales de oxidación. Este esquema consiste en un canal circular u ovalado por el cual circula el licor mezcla impulsado por aireadores mecánicos de eje horizontal. En estos reactores son fundamentales las operaciones de mezcla y de aireación. En uno o en varios puntos del canal se suministra oxígeno, originándose dos zonas entre cada dos puntos de aireación: una aerobia (al aumentar la distancia del punto de aireación disminuye la concentración de oxígeno) y una anóxica (que comienza cuando la concentración de oxígeno es cero, prolongándose hasta alcanzar el siguiente punto de aireación). En el inicio de esta zona es donde se establece la entrada del agua residual, permitiendo que parte de la materia orgánica sea degradada gracias al aporte de nitratos de la zona aireada. Los sistemas de carrusel y orbital son considerados ejemplos de canales de oxidación.

Eliminación de materia orgánica y fósforo

El esquema del proceso más simple es el A/O (Tracy & Hong 1990), el cual consiste en una secuencia de etapas anaerobias y aerobias (figura 1.6). En la etapa anaerobia tiene lugar la asimilación de AGV en forma de PHA y la liberación de fósforo a partir de los polifosfatos almacenados. En la etapa aerobia se consume la materia orgánica almacenada (PHA), al tiempo que se reduce la concentración de ortofosfatos en el medio extracelular como consecuencia de su captura y almacenamiento dentro de la célula.

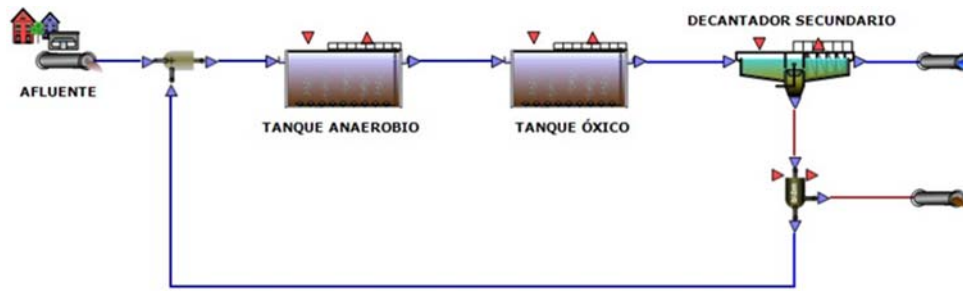


Figura 1.6. Esquema A/O. Fuente: software WEST.

La transformación de un proceso convencional de fangos activos mediante la transformación del sedimentador primario en reactor anaerobio puede convertirlo en un esquema para la eliminación biológica de fósforo (esquema EASC, *extended anaerobic sludge contact*).

Eliminación de materia orgánica, nitrógeno y fósforo.

Cuando el objetivo es la eliminación conjunta de nitrógeno, fósforo y materia orgánica se hace necesario la combinación de zonas anaerobias, anóxicas y aerobias.

Esquema A²/O. Este proceso es una modificación del A/O que incluye un reactor anóxico entre los reactores anaerobio y aerobio, siendo el esquema más sencillo que permite la eliminación de nitrógeno y fósforo (Tracy *et al.*, 1990) (figura 1.7). Este esquema consiste en una secuencia de tres etapas (anaerobia, anóxica y aerobia) con una corriente de recirculación interna que va del reactor aerobio al anóxico. Dentro del reactor anaerobio de este esquema tiene lugar el consumo de parte de la materia orgánica, con la consiguiente liberación de ortofosfatos al medio. En el reactor anóxico tiene lugar la desnitrificación de los nitratos provenientes del reactor aerobio a través de la recirculación interna. En el reactor aerobio tiene lugar el consumo de la materia orgánica que no haya sido consumida de forma anaeróbica y anóxica, además del proceso de nitrificación y de la captación de fósforo como consecuencia del consumo de la materia orgánica almacenada intracelularmente por las PAO.

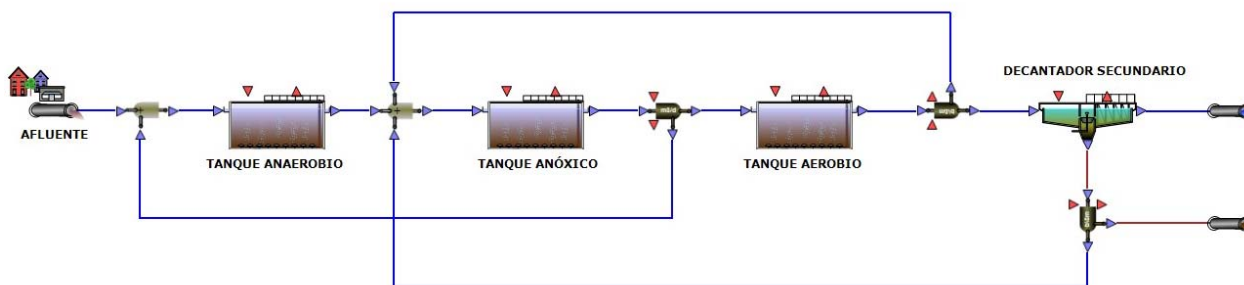


Figura 1.7. Esquema A²/O. Fuente: software WEST.

Existe una gran diversidad de esquemas de proceso derivados del A²/O. Así, el esquema del proceso UCT (Universidad de Ciudad del Cabo) dispone de la misma secuencia de etapas que el A²/O, diferenciándose de este por recircular la corriente externa de fangos al tanque anóxico. La finalidad de este cambio es la obtención de condiciones anaerobias más estrictas en el primer reactor de la serie al eliminarse parte de los nitratos que provienen del sedimentador. En el esquema del proceso UCT, se debe optar por un valor de la corriente de recirculación interna que haga que la concentración de nitratos sea baja. En caso contrario, estas especies químicas aparecerían en el reactor anaerobio, desapareciendo las ventajas de este esquema frente al A₂/O. Trabajar de la forma indicada implica una capacidad limitada de eliminación del nitrógeno. Estos inconvenientes desaparecen si se divide la etapa anóxica en dos. A este nuevo esquema de proceso se le conoce como UCT modificado. El proceso VIP (*Virginia Initiative Plant*) (Randall *et al.*, 1990) dispone del mismo esquema UCT, a diferencia de que cada una de las etapas se encuentra compartimentada en una serie de múltiples reactores de mezcla completa. Una alternativa al proceso UCT y al VIP la constituye el esquema del proceso JHB (*Johannesbourg*). En este caso se introduce un tanque anóxico exterior a la línea de tratamiento, mediante el cual se eliminan los nitratos de la corriente de recirculación externa de fangos. Ese esquema es interesante cuando la relación entre materia orgánica y nutrientes en el afluente es desfavorable. El esquema de proceso ISAH (*Institut für Siedelungswasservirtschaft und Abfalltechnik der Universität Hannover*) es muy parecido al JHB, caracterizándose por la existencia de una etapa anóxica a través de la cual se hace pasar la corriente de recirculación interna de fangos procedente del reactor anaerobio. Este esquema es interesante cuando se necesita un aporte de sustrato en el tanque anóxico para la desnitrificación. El esquema de proceso RAnDN (reaireación-anaerobio-desnitrificación-nitrificación) (Wanner *et al.*, 1990) constituye una mejora del proceso A²/O en el cual el fango recirculado es reaireado. Con este esquema se mejora la sedimentabilidad del fango y la eliminación del nitrógeno. Otro esquema de proceso derivado del A²/O es el Bardenpho de cinco etapas, que adiciona al esquema anterior dos nuevas etapas: una anóxica y una aerobia o de postaireación. Como consecuencia de la doble secuencia anóxica-aerobia, este esquema consigue mejores rendimientos en la eliminación total del nitrógeno. La etapa de postaireación elimina el nitrógeno en forma de gas, mejorando la sedimentabilidad y

aportando oxígeno para evitar condiciones anaerobias en el clarificador secundario. Es especialmente recomendable cuando existe una buena relación entre materia orgánica y nutrientes.

Esquema reactor discontinuo secuencial. En el esquema SBR (*sequencing batch reactor*) el agua residual afluyente se introduce en régimen discontinuo en un reactor, en el cual se suceden de forma temporal y ordenada una serie de ciclos de operación. Las etapas de las que consta un reactor de este tipo son cinco:

- Etapa de llenado. Durante esta etapa el afluyente a tratar entra en el reactor. El grado de interacción que se produce entre el fango activo que está en el reactor y el agua residual que entra depende del estado de los sistemas de aireación y de agitación.
 - Llenado estático. El sistema de aireación y mezclado no se encuentran en operación. Esto permite la acumulación de sustrato en el reactor ya que durante el llenado no tienen lugar procesos de biodegradación.
 - Llenado con mezcla. Durante la etapa de llenado el contenido del reactor se encuentra mezclado pero no aireado, permitiendo que en el interior del mismo tengan lugar reacciones anóxicas o anaerobias, dependiendo de la presencia o ausencia de nitratos.
 - Llenado con aireación. A diferencia de los dos casos anteriores, el contenido del reactor se mantiene mezclado y aireado. Esto permite que en el reactor tengan lugar reacciones aerobias.

Cuando se realiza un llenado estático o cuando se permiten las transformaciones bioquímicas pero la duración de la fase de llenado es corta, la biomasa estará inicialmente expuesta a altas concentraciones de materia orgánica. Por otra parte, cuando la etapa de llenado no sea estática y su duración sea larga, la biomasa estará expuesta a concentraciones bajas y relativamente constantes. En el primer caso el comportamiento es semejante al de un sistema continuo de flujo en pistón, o bien a varios reactores de mezcla completa dispuestos en serie, mientras que en el segundo caso el comportamiento es semejante al de un reactor de mezcla completa.

Durante el llenado del reactor también se pueden dar las transformaciones bioquímicas, pudiendo ser considerada como una etapa de “llenado y reacción”, donde la reacción continúa cuando el llenado ha finalizado.

- Etapa de reacción. En esta etapa tienen lugar las reacciones bioquímicas a través de los microorganismos. En esta fase también existe la opción de imponer distintas condiciones operacionales en el reactor, permitiendo que esta etapa se pueda dividir a su vez en varias etapas.

- Mezcla. El contenido del reactor se mantiene mezclado sin aporte de oxígeno. Por lo tanto, se pueden producir reacciones anóxicas o anaerobias, según el aceptor de electrones presente en el medio.
 - Mezcla aerobia. En este caso el contenido del reactor se mantiene mezclado y aireado, lo que permite que tengan lugar reacciones aerobias.
- Sedimentación. En esta etapa tiene lugar la decantación del fango activo, previa detención de la aireación y agitación, obteniéndose un efluente clarificado. Al estar el licor mezcla en reposo, la eficiencia de la decantación suele ser mayor que en los sistemas en continuo.
 - Vaciado. En esta etapa el agua clarificada se retira del reactor, de manera que este queda disponible para recibir un nuevo volumen de agua residual a tratar.
 - Fase de inactividad. Es el tiempo que transcurre desde que acaba la fase de descarga hasta que comienza un nuevo ciclo. En sistemas con varios reactores en paralelo esta fase permite que un reactor acabe su etapa de llenado antes de iniciar el llenado de otro reactor. No es una fase necesaria, y en caso de que se pueda conseguir un caudal de entrada constante, por ejemplo; a través de un tanque de homogeneización, se puede suprimir.

En un SBR, la purga de fangos en exceso se puede realizar al final de la etapa de decantación o bien al final de la etapa de reacción. La principal ventaja que presentan los sistemas SBR es su gran flexibilidad, puesto que permiten controlar de una forma fácil el tiempo de cada uno de los ciclos de operación.

1.4 Definición de los principales parámetros operacionales de diseño en EDAR

La carga másica (CM), la edad del fango (EF), el tiempo de retención hidráulico (TRH) y el oxígeno disuelto (OD) son los parámetros operacionales básicos de diseño en EDAR más utilizados en la explotación diaria de las instalaciones.

1.4.1 Carga másica y edad del fango

La CM representa la DBO_5 que llega diariamente al tratamiento biológico en relación con la masa de fangos en el reactor, expresada en forma de sólidos suspendidos del licor mezcla (SSLM). Se puede definir en función de los sólidos suspendidos volátiles (SSVLM), en tal caso representa una aproximación de la relación entre alimento y microorganismos presentes, ya que los SSVLM también incluyen los sólidos volátiles inertes. La limitación más importante de este parámetro operacional se encuentra en el tiempo necesario para el cálculo de la DBO_5 (5 días), haciéndolo poco operativo y práctico en las EDAR, pues no permite realizar maniobras en planta con suficiente

antelación. La DQO en ocasiones puede ser utilizada para estimar la DBO_5 después de una operación física unitaria, como por ejemplo la decantación primaria. A estas limitaciones hay que añadir la falta de estudios sobre la inercia biológica de la CM, además de la EF, en la comunidad de microorganismos del fango activo. En este sentido, Salvadó & Gracia (1993) encontraron una relación mayor de las variaciones de las poblaciones de protistas con el promedio de la CM de los dos días anteriores al recuento de organismos.

La EF representa la relación expresada en días entre la masa de fango en el reactor y la masa de fangos eliminada diariamente de la instalación. Dicho parámetro aproxima el tiempo de retención de los microorganismos en la EDAR, ya que estos siguen un ciclo desde que son decantados y recirculados al reactor, hasta que salen por la corriente de purga de fangos en exceso. Aunque la fórmula para el cálculo de la EF es bien conocida, su interpretación biológica ha sido escasamente explorada, puesto que esta depende a su vez de otras variables (covariables), como son: la CM, la temperatura (T^a_r) y el tiempo de retención hidráulico en el reactor (TRHr). En este sentido, Salvadó (1994) propuso un modelo matemático para la estimación de la EF basado en las poblaciones de protistas ciliados en el fango activo. Actualmente, la EF tiene más utilidad para el diseño que para el control rutinario en las EDAR, determinando al final que la estrategia principal sea establecer un régimen de purgas de fangos en exceso hasta mantener la concentración deseada de SSLM en el reactor que permita cumplir los objetivos de explotación mediante “prueba-efecto”.

Las variables CM y EF conceptualmente guardan entre sí una relación inversa. Este concepto contrapuesto es posible entenderlo a partir de las fórmulas aplicadas para su cálculo, es decir, al reducir las purgas de fangos en exceso se eleva la concentración de SSLM y la EF, disminuyendo así la CM al incrementarse el valor del denominador en la fórmula de esta última. Por lo tanto, se esperaría una evolución inversa y proporcional de ambos parámetros, siempre que se considere principalmente que la carga orgánica y la T^a_r a la cual se produce la oxidación biológica no varíen con el tiempo. El sustrato puede variar en un espacio corto (horas, días) o largo de tiempo (meses) y la temperatura puede fluctuar en mayor o menor grado en función de la estacionalidad y de la situación geográfica de las EDAR. Algunos estudios en EDAR a escala real indican que ambas variables no siempre evolucionan de forma inversa y proporcional, debido probablemente a su dependencia y relación con otras variables (Zornoza *et al.*, 2010, 2012a).

1.4.2 *Tiempo de retención hidráulico*

El TRH se define como el tiempo (horas) que permanece un volumen del afluente en cualquier operación física unitaria o proceso biológico. Se trata de un parámetro de control operacional muy utilizado en decantación primaria y secundaria, pero probablemente muy poco utilizado y considerado en el reactor biológico. Conceptualmente dicha

variable influye de forma directa en la CM, ya que condiciona el tiempo de contacto del sustrato con el aceptor de electrones.

1.4.3 Oxígeno disuelto

El OD, a pesar de su fácil medición en continuo en el reactor, es probablemente el parámetro que más dificultades ocasiona a la hora de obtener valores representativos diarios, principalmente en aquellas instalaciones que sufren fluctuaciones importantes en el aporte de OD y operan en modo aireación intermitente para la eliminación del nitrógeno. Valores elevados de OD causan un gasto energético innecesario, mientras que valores bajos pueden originar una depuración insuficiente. Por ello, es fundamental para una explotación sostenible el ajuste de los niveles necesarios para el cumplimiento de los objetivos en la depuración.

La T^{ar} no se considera estrictamente un parámetro operacional, ya que su variación viene impuesta principalmente por la estacionalidad, pudiendo depender además del tamaño del reactor, sistema de aireación y situación geográfica. Su medición es fundamental, puesto que condiciona la concentración de SSLM y EF a mantener en el reactor biológico.

1.5 El floculo como unidad fundamental estructural y funcional del fango activo

Para que el proceso de depuración se lleve a cabo con éxito, en el reactor biológico deben formarse floculos de tamaño suficiente para soportar las turbulencias del agua en el sistema de agitación y poder sedimentar posteriormente, obteniendo de esta forma un sobrenadante claro y libre de turbidez. El floculo, como unidad fundamental estructural y funcional del fango activo, está formado por la agregación de partículas orgánicas e inorgánicas del agua residual junto con bacterias formadoras de floculo y bacterias filamentosas, todo ello gracias a un proceso facilitado por la excreción de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) de origen microbiano (Jenkins *et al.*, 2004). Además, en el floculo se encuentran asociadas unas comunidades de organismos superiores (protistas y metazoos) que desempeñan un papel fundamental en la depuración.

Las SPE son producidas por los microorganismos a través de la lisis celular o por secreción activa (Sutherland, 2001), desempeñando un papel importante en la formación de los floculos como constituyente mayoritario de la fracción orgánica (Frolund *et al.*, 1996). Dichas sustancias están formadas por proteínas, compuestos húmicos, carbohidratos, ácidos nucleicos y lípidos (Frolund *et al.*, 1996; Urbain *et al.*, 1993). Las SPE presentan altas concentraciones de carbohidratos y proteínas durante el invierno (Wilén *et al.*, 2008). Varios estudios muestran que son muy importantes para la fuerza, tamaño y propiedades de la superficie del floculo (Mikkelsen & Keiding, 2002; Sponza, 2003). Debido a la alta carga de densidad negativa de las SPE, los cationes juegan un papel importante en el proceso de biofloculación. Además, las SPE actúan como un ligamiento de unión de los diferentes constituyentes

del floculo unidos por fuerzas electrostáticas descritas por la teoría de DLVO (Zita & Hermansson, 1994), ponteados por cationes multivalentes, como son el Mg^{2+} , Ca^{2+} y Fe^{3+} (Keiding & Nielsen, 1997), entramado de moléculas (Rijnaarts *et al.*, 1995) e interacciones hidrofóbicas (Urbain *et al.*, 1993).

En el floculo del fango activo se presentan dos niveles estructurales básicos (Sezgin *et al.*, 1978): la microestructura y la macroestructura. La microestructura la confieren procesos de agregación microbiana y biofloculación. Esta es la base de la formación del floculo, ya que sin la capacidad de un organismo para adherirse a otro, nunca se formarían los grandes agregados de microorganismos presentes en el fango activo. La macroestructura de los floculos del fango activo la proporcionan las bacterias filamentosas, formando una especie de “estructura tridimensional” dentro del floculo donde las bacterias formadoras de floculo (microestructura) se adhieren. Por lo tanto, generan la consistencia suficiente para que puedan formarse floculos grandes y compactos que resistan la turbulencia del sistema de agitación en el reactor biológico. La presencia moderada de bacterias filamentosas también ayuda a capturar y mantener atrapadas partículas de pequeño tamaño durante la sedimentación. En un floculo ideal las bacterias filamentosas y las formadoras de floculo crecen en equilibrio (figura 1.8).

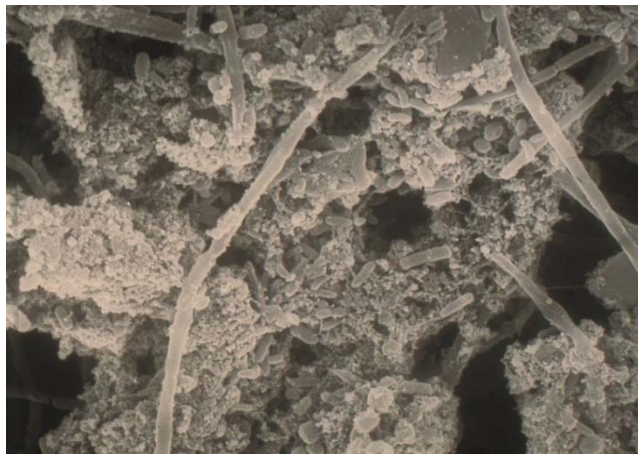


Figura 1.8. Estructura flocular. SEM, 5000x. Autor: Cundell.

1.6 La comunidad biótica del fango activo

Los procesos de tratamiento biológico del agua residual se basan en la habilidad de la depuración natural de las comunidades microbianas. Sin embargo, la principal diferencia respecto del ambiente acuático se basa en ciertas características, un flujo de entrada de elevada carga orgánica que produce unos procesos de descomposición acelerada, biomasa condicionada por bajos tiempos de retención y la prevalencia en el sistema de organismos heterótrofos. Estos procesos dependen de la capacidad de la comunidad microbiana para utilizar los compuestos

del agua. No existe un único organismo capaz de utilizar todos los compuestos orgánicos presentes en las aguas residuales, por lo tanto, un proceso biológico constituye un ecosistema diverso que se alimenta directamente del agua cruda que entra al sistema y que depende del diseño y condiciones de operación de la planta, así como de las características fisicoquímicas del agua residual afluyente y licor mezcla. Debido a estas características, el proceso biológico de tratamiento del agua residual podría denominarse como un proceso biotecnológico creado por el hombre sujeto a condiciones ambientales extremas.

La clasificación de organismos se lleva a cabo en base a la secuenciación y comparación de sus rRNA. En el caso de los dominios *Bacteria* y *Archaea*, principalmente basados en las secuencias del gen codificante para la subunidad 16S del RNA ribosomal, mientras que para *Eucarya* se utiliza la fracción 18S rRNA. A partir de la comparación de las secuencias 16S/18S RNA se establecen los árboles filogenéticos, donde queda reflejada la distancia evolutiva de los distintos organismos. Es decir, cuanto más cerca se encuentran las ramas de dos organismos, más próximos se encuentran en términos de evolución. En la figura 1.9 se representa el árbol filogenético universal en forma de abanico con los tres dominios de la vida. Dos de ellos representan los organismos procariotas (*Bacteria* y *Archaea*), y el restante representa a los organismos eucariotas (*Eukarya*).

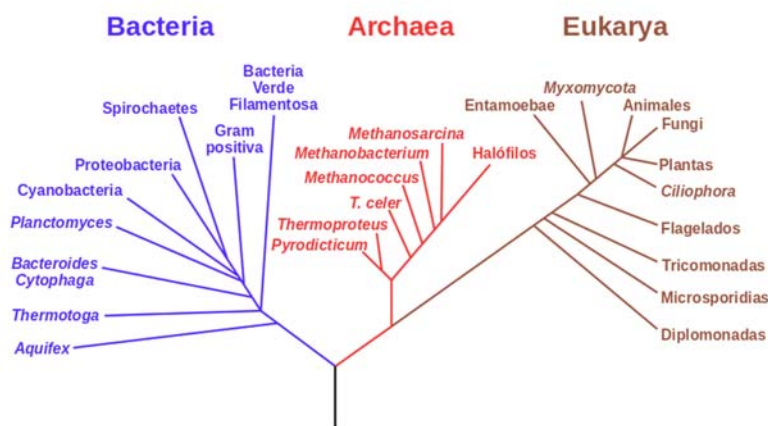


Figura 1.9. Árbol filogenético de la vida.
Fuente: Madigan *et al.* (2009).

El proceso biológico de fangos activos se encuentra constituido por bacterias, arqueobacterias, cianobacterias, protistas, metazoos, hongos y algas (Seviour & Nielsen, 2010b). Las bacterias y los protistas son considerados como los principales responsables de la eficiencia en el tratamiento biológico del agua residual. Cada una de estas poblaciones desempeña un papel determinado en el proceso y en conjunto forman la comunidad biótica característica de los fangos activos. En los siguientes apartados se describen los principales grupos de organismos, describiendo con mayor detalle los protistas, metazoos y bacterias filamentosas.

1.7 Archeobacterias y bacterias

Algunos estudios indican la presencia de *arqueas* metanogénicas en fangos activos (Gray *et al.*, 2002). Desde entonces, pocos estudios han explorado dichas poblaciones en estos sistemas como para destacar su papel dentro de la comunidad de microorganismos (Reyes *et al.*, 2015). A pesar de ello, algunos estudios las relacionan dentro de la comunidad de organismos nitrificantes (apartado 1.7.2).

Los organismos más directamente relacionados con el tratamiento del agua residual son las bacterias, las cuales dominan sobre otros grupos en número y biomasa, e intervienen en el proceso de mineralización y eliminación de la materia orgánica y nutrientes. Además, constituyen la mayor fracción de la biomasa del fango activo (90-95% de la biomasa existente) siendo, por lo tanto, el grupo dominante dentro de la microbiota de los fangos activos. Su pequeño tamaño y su elevada relación superficie/volumen favorecen el intercambio de nutrientes y catabolitos con el medio que los rodea.

Aunque las bacterias pueden ser clasificadas en base a ciertos criterios (donador de electrones, fuente de carbono, aceptor terminal de electrones, etc.), algunos autores las agrupan según su función e importancia dentro de la estructura de la comunidad del fango activo (Seviour & Nielsen, 2010a). De esta forma, las bacterias dentro de la comunidad quedarían agrupadas de la siguiente forma: quimioorganoheterótrofas, desnitrificantes, degradadoras de polímeros, bacterias del hierro, bacterias reductoras de sulfato, acumuladoras de PHA, GAO, PAO y quimiolitotróficas (nitrificantes y bacterias oxidadoras de sulfuros). A continuación se describe muy brevemente los grupos más relevantes.

1.7.1 Bacterias quimioorganoheterótrofas

Las bacterias quimioorganoheterótrofas son consideradas como el grupo mayoritario en el fango activo (Seviour & Nielsen, 2010a). Estudios realizados con la técnica de hibridación *in situ* con sondas de oligonucleótidos marcadas con fluoróforos (FISH, *fluorescence in situ hybridization*) han determinado que la clase *Betaproteobacteria*, y especialmente miembros de *Comamonadaceae*, incluyendo *Acidovorax* sp. (Schulze *et al.*, 1999), se encuentran entre las bacterias dominantes. La clase *Alfaproteobacteria* incluye las *Sphingomonas*, frecuentes en fangos activos (Neef *et al.*, 1999). *Caulobacter* puede ser aislada fácilmente del fango activo, y especies de *Hyphomicrobium* han sido detectadas dentro de la comunidad del fango (Holm *et al.*, 1996). Las clases *Gammaproteobacteria* y *Betaproteobacteria* se encuentran bien representadas en comunidades de fangos activos que tratan tanto aguas domésticas como industriales. La clase *Deltaproteobacteria* ha sido detectada en algunas comunidades bacterianas de fangos activos, representadas principalmente por las bacterias reductoras de sulfato: *Desulfovibrionaceae* y *Desulfobacteriaceae* (Manz *et al.*, 1998).

Una gran atención se ha centrado en detectar numerosos miembros previamente no descritos y filogenéticamente diversos de los filo *Chloroflexi*, *Bacteroidetes* y *Planctomycetes* en plantas convencionales y EBPR. El filo *Chloroflexi* incluye bacterias filamentosas responsables del *bulking* filamentoso, como son los morfotipos 1851 y 0092, mientras que el filo *Planctomycetes* incluye el morfotipo filamentoso *Nostocoida limicola* III. Otros organismos en fangos activos difícilmente o no cultivables incluyen a los filo *Verrucomicrobia* y *Acidobacteria* (Loy *et al.*, 2002), así como el grupo OM11 y TM7, este último incluye algunos organismos filamentosos del tipo 0041. El filo *Firmicutes* aparece de forma común, pero no con poblaciones dominantes (Meier *et al.*, 1999).

1.7.2 Bacterias relacionadas con el proceso de nitrificación

Las bacterias nitrificantes viven en una gran variedad de hábitats, incluyendo agua dulce (agua potable y aguas residuales), agua de mar, agua salobre y en el suelo. Las principales especies presentes en los fangos activos son autótrofas, es decir, utilizan el dióxido de carbono o carbono inorgánico como fuente de carbono para la síntesis de material celular. Por cada molécula de dióxido de carbono asimilado, se oxidan aproximadamente 30 moléculas del ión amonio o 100 moléculas de nitrito. Debido a la gran cantidad de iones amonio y nitrito necesarios para asimilar dióxido de carbono, las bacterias nitrificantes tienen una velocidad de crecimiento lento (Gerardi, 2002), además de caracterizarse por poseer sistemas membranosos internos complejos.

Recientemente se ha descubierto que algunos organismos del dominio *Archaea* son capaces de llevar a cabo el proceso de oxidación del amonio (AOA, *Archaea* oxidantes de amonio) en océanos y suelos bajo ciertas condiciones ambientales extremas, asociadas principalmente a ecosistemas que presentan elevada salinidad y temperatura, y muy baja disponibilidad de nutrientes (Seviour & Nielsen, 2010a). Por tanto, la oxidación secuencial aeróbica del amonio a nitrito y luego a nitrato pueden ser catalizados por organismos procariotas quimiolitótrofos: BOA, AOA y BON.

Bacterias oxidantes de amonio. Todos los géneros de BOA conocidos pertenecen al filo *Proteobacteria*, dentro del cual se distinguen dos clases: las betaproteobacterias, cuya presencia es mayoritaria en los procesos de tratamiento de aguas residuales, y las gammaproteobacterias, las cuales son halófilas y no tienen presencia significativa en los procesos biológicos de las EDAR. Las BOA de la clase *Betaproteobacteria* se dividen en cuatro géneros: *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosovibrio* y *Nitrosolobus*.

Arqueas oxidantes de amonio. Algunos estudios indican la capacidad de organismos pertenecientes al dominio *Archaea* de llevar a cabo la oxidación del amonio en suelos y océanos (Schleper *et al.*, 2005), confirmándose finalmente que estos organismos juegan un papel importante en la nitrificación en ecosistemas marinos y terrestres (Beman *et al.*, 2008).

Bacterias oxidantes de nitrito. Las BON se caracterizan por ser un grupo más diverso que las BOA. Las especies descritas, a excepción de *Nitrospira*, *Nitrospina* y *Nitrolanceus*, se encuentran dentro del filo *Proteobacteria*. *Nitrobacter*, perteneciente a las alfaproteobacterias, ha sido considerado como predominante en los sistemas de tratamiento de aguas residuales (Henze *et al.*, 1997), hasta que estudios posteriores en plantas a escala real basados en técnicas moleculares confirmaron que *Nitrospira* era la especie clave en este proceso (Juretscho *et al.*, 1998), a excepción de reactores que tratan elevadas concentraciones de nitrito, en los que *Nitrobacter* puede alcanzar una abundancia relativamente alta (Daims *et al.*, 2001). Esto es debido a que *Nitrobacter* presenta mejor adaptación a altas concentraciones de NO_2^- , mientras que *Nitrospira* se adapta mejor a las bajas concentraciones (Schramm *et al.*, 1999). Dentro del filo *Proteobacteria*, asociadas a ambientes marinos, se encuentran los géneros *Nitrococcus* (*N. mobilis*) en la clase *Gammaproteobacteria* y *Nitrotoga* (*N. artica*) en la clase *Betaproteobacteria* (Alawi *et al.*, 2007).

1.7.3 Bacterias relacionadas con el proceso de desnitrificación

Los organismos con capacidad de desnitrificación se encuentran de forma generalizada dentro de los dominios *Bacteria* y *Archaea*. Los géneros desnitrificantes organotróficos más comunes de los sistemas de fangos activados son: *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Hypomicrobium*, *Moraxella* y *Pseudomonas* (Wanner, 1994a). Algunos autores han señalado que la abundancia de las poblaciones dominantes de bacterias desnitrificantes varía significativamente de una planta a otra, dependiendo de las características del afluente, configuración del proceso y las condiciones de operación (Lu *et al.*, 2014).

Diferentes microorganismos poseen capacidad de desnitrificación completa, parcial o incluso ausente, pudiendo ser divididos con mayor precisión dentro de cinco subgrupos: organismos con capacidad de desnitrificación completa (capaces de reducir tanto el nitrato como el nitrito a N_2), reductores de nitritos (solo capaces de reducir el nitrito a N_2), con capacidad incompleta de desnitrificación (reducen nitrito o nitrato a óxido de nitrógeno), reductores incompletos de nitrito (capaces de reducir el nitrito a compuestos intermedios de óxido de nitrógeno) y no capaces de desnitrificar (no capaces de reducir nitrito o nitrato). Algunos de los ejemplos de microorganismos que se corresponden con las categorías anteriores son: *Hypomicrobium* sp., desnitrificación completa (Sperl & Hoare, 1971), *Methyloversatilis* sp., desnitrificación incompleta (Lu *et al.*, 2012), algunas cepas de *Pseudomonas* sp., reductores incompletos de nitritos (Vangnai & Klein, 1974). En sistemas de desnitrificación del agua residual es probable que las bacterias con diferentes capacidades de reducción del óxido de nitrógeno contribuyan juntas como sumidero de nitrógeno.

1.8 Bacterias filamentosas

Las bacterias filamentosas se originan por división celular de ciertas especies bacterianas bajo condiciones específicas en el medio donde se desarrollan. Las células resultantes de la división celular no se separan, quedando asociadas entre sí y formando largos filamentos que en ocasiones pueden llegar a medir varios milímetros de longitud (Parody, 1997).

Estos microorganismos son habituales, junto con protistas y metazoos, de la microbiota de las EDAR, relacionados con la degradación de la materia orgánica y desempeñando un papel esencial en la formación flocular (Madoni *et al.*, 2000). Una presencia moderada de filamentos contribuye a una buena formación del flóculo, así como a la captura y al atrapamiento de partículas pequeñas durante la sedimentación del fango activo, generando así un efluente de mayor calidad. Su abundancia relativa en condiciones normales no excede del 1-3% del total de la biomasa (Kragelund *et al.*, 2009). Bajo determinadas condiciones ambientales pueden competir con otras bacterias que forman el flóculo y crecer de forma excesiva originando serios problemas de separación del fango activo en el clarificador secundario, denominados *bulking* (hinchazón de fangos) y *foaming* (formación de espumas de origen biológico) (figura 1.10). Muchas de las razones de su excesivo crecimiento se encuentran recogidas y discutidas en distintas revisiones y manuales (Eikelboom 2000; Jenkins *et al.*, 2004; Tandoi *et al.*, 2006). Con el fin de controlar el crecimiento de estos microorganismos, se hace imprescindible su correcta identificación, así como el conocimiento de aquellas variables que originan su crecimiento.



Figura 1.10. Problemas de separación del fango activo. (a) *Foaming* o espumación. (b) *Bulking* o hinchazón de fangos. Autor: Andrés Zornoza.

1.8.1 Aspectos históricos. Los primeros pasos hacia el sistema de identificación convencional

Uno de los primeros autores que centraron sus estudios en el concepto del *bulking* filamentoso fue Pipes (1967): “...el *bulking* se define como una mala sedimentación de los flóculos del fango activo que afecta negativamente a las plantas de tratamiento de las aguas residuales. Dicho fango abultado es difícil de controlar, siendo muy baja la capacidad de recirculación de las bombas. Como resultado se produce un deterioro de la calidad del efluente debido al escape de flóculos. La principal razón de las malas propiedades de sedimentación es debida a la presencia de microorganismos filamentosos flotando libremente en el licor mezcla o saliendo de los flóculos...”.

Dos años más tarde, en 1969, fue descrito en Estados Unidos por primera vez la formación de espumas biológicas o *foaming* tras el suceso del “Misterio de Milwaukee” en la localidad de Milwaukee (Anonymous, 1969). En dicho suceso se documentó una creciente masa flotante de sólidos y de microorganismos surgida en una EDAR, observándose que la masa de espumas contenía gran cantidad de microorganismos actinomicetos ramificados Gram positivos. Posteriormente estas bacterias fueron identificadas como pertenecientes al género *Nocardia*, y por ello a estas espumas se las empezó a conocer como “*Nocardia* foams”.

Los primeros intentos de control de los microorganismos filamentosos fueron bastante confusos y frustrantes, debido a la incapacidad para identificar los organismos que originaban dichos episodios. Al principio se pensaba que la bacteria con vaina *Sphaerotilus natas* era la única responsable de las disfunciones observadas en el fango activo, siendo muchos los autores que lo atribuyeron, entre ellos (Arderne & Lockett, 1923). Algunas especies de *Bacillus*, *Beggiatoa*, actinomicetos y hongos también fueron identificadas dominando solas o junto a *S. natas*, relacionándolas con la mala sedimentabilidad del fango activo.

Entre los años 1970 y 1973 numerosos estudios fueron publicados revelando una gran cantidad de bacterias filamentosas relacionadas con los episodios de *bulking* (Cyrus & Sladka, 1970; Hiinerberg *et al.*, 1970; Farquhar & Boyle, 1971a, b; Mulder *et al.*, 1971; Van Veen, 1973; Sladka & Ottova 1973). De todos ellos se concluyó que existían una gran variedad de microorganismos filamentosos que se encontraban relacionados con estos episodios, esperándose la presencia de muchos más que no estuvieran relacionados. Estas observaciones preliminares condicionaron a Eikeboom (1975) a llevar a cabo el primer gran estudio que marcó sin duda los primeros pasos hacia el sistema de identificación convencional de bacterias filamentosas. El objetivo de dicho estudio se centró en obtener más información sobre la ocurrencia de bacterias filamentosas en fangos activos, realizando para ello un análisis de 1100 muestras procedentes de 200 EDAR.

La primera clasificación de Eikelboom se basó en las siguientes características morfológicas y respuestas a tinciones: presencia o ausencia de vaina, movilidad, ramificación, forma y longitud de los filamentos, resultados de la tinción de Gram, diámetro, longitud y forma de las células, presencia o ausencia y composición de inclusiones. En base a

estas características, fueron distinguidos y clasificados de forma preliminar 26 tipos o morfotipos de organismos filamentosos que se englobaron dentro de los siguientes grupos:

- Grupo I. Bacterias formadoras de vaina Gram negativas: *Sphaerotilus natans*, tipo 1701, tipo 1702, tipo 0321 y *Haliscomenobacter hydrossis*.
- Grupo II. Bacterias formadoras de vaina Gram positivas: tipo 0041, tipo 0675 y tipo 1851.
- Grupo III. Bacterias con menos vaina, enrolladas y multicelulares similares a las algas verde azuladas: cianobacterias, tipo 021N y *Nostocoida limicola* *nom. Prov.*
- Grupo IV. Bacterias delgadas y en forma de espiral: *Microthrix parvicella* *nom. Prov.*, tipo 0581 y tipo 0912.
- Grupo V. Bacterias Gram negativas multicelulares y rectas: tipo 0803, tipo 1091, tipo 0092 y tipo 0961.
- Grupo VI. Bacterias móviles por deslizamiento: tipo 0914, *Beggiatoa* sp., tipo 1111 (*Flexibacter* sp.) y tipo 1501.
- Grupo VII. Otros tipos: tipo 0411, hongos y *Nocardia* sp.

Estos grupos fueron agrupados para una mejor comprensión en tres agrupaciones:

- Bacterias atribuibles a géneros y especies conocidas ya registradas en *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, como por ejemplo: *Sphaerotilus natans*, *Haliscomenobacter hydrossis*, *Beggiatoa* y *Flexibacter*.
- Microorganismos que, aunque tienen nombre ("*M. parvicella*", *Nostocoida limicola*), no están presentes en *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* debido a la escasa información fenotípica disponible.
- Microorganismos los cuales fueron imposibles atribuir una identidad, estableciéndose su denominación principalmente con un código numérico de cuatro cifras precedido por la denominación "tipo o morfotipo".

Con las primeras aportaciones de Eikelboom en 1975 se sientan las primeras bases de la identificación, caracterizando aquellos organismos que aparecen relacionados con episodios de *bulking* (Eikelboom, 1977). Hasta ese momento, junto con las aportaciones de otros investigadores, quedaron descritos un total de 30 organismos filamentosos. Este avance permitió comenzar a unificar criterios con el fin de intentar dar solución al problema del *bulking*.

1.8.2 Identificación de bacterias filamentosas

Técnicas convencionales para la identificación de bacterias filamentosas

En 1981, Eikelboom y van Buijsen recopilan todos sus conocimientos y publican la primera guía sistemática que describe los principales organismos filamentosos, permitiendo su distinción mediante claves dicotómicas basadas en rasgos morfológicos y respuestas a las tinciones clásicas diferenciales (principalmente Gram y Neisser). La nueva lista de organismos filamentosos parte de la publicada en 1975, eliminando algunos morfotipos e incorporando otros nuevos. De esta forma son descritos 29 organismos filamentosos, de los cuales a excepción de los poco frecuentes (marcados con *), son incorporados en las claves de identificación convencional: *Beggiatoa*, cianofíceas, *Flexibacter*, hongos, *Haliscomenobacter hydrossis*, *Microthrix parvicella*, *Nocardia*, *Nostocoida limicola* (I, II y III), *Sphaerotilus natans*, *Streptococcus*, *Thiothrix* (I y II), tipo 0041, tipo 0092, tipo 0211*, tipo 021N, tipo 0411, tipo 0581, tipo 0675*, tipo 0803, tipo 0914, tipo 0961, tipo 1701, tipo 1702*, tipo 1851, tipo 1852* y tipo 1863.

Posteriormente Jenkins *et al.* (1984, 1993) publican las dos primeras ediciones de un manual donde queda recogido una descripción ligeramente modificada de los organismos propuestos por Eikelboom & van Buijsen (1981). Los caracteres especiales que identifican los tipos de organismos filamentosos son los siguientes (Jenkins *et al.*, 1993):

- 1) *Ramificación*: presente o ausente, y si está presente, si es verdadera o falsa.
- 2) *Movilidad*: ausente, o si la hay, describirla.
- 3) *Forma del filamento*: recto, ligeramente curvado, doblado, irregular “cadena celular”, enrollado, o micelial.
- 4) *Color*: transparente, medio, oscuro.
- 5) *Ubicación*: extendiéndose fuera del flóculo, principalmente dentro del flóculo, o interflocular.
- 6) *Crecimiento adherido* (unicelular): presente o ausente, y si existe, si es importante o incidental.
- 7) *Vaina*: presente o ausente.
- 8) *Paredes transversales (septos celulares) y constricciones*: visible o no visible.
- 9) *Diámetro y longitud del filamento*: medidos en μm .
- 10) *Forma celular*: cuadrada, rectangular, ovalada, forma de barril, discoidal y forma de varilla.
- 11) *Tamaño*: anchura y longitud medias de las células en μm .
- 12) *Depósitos de azufre*: presencia o ausencia “in situ”, y presencia de gránulos o ausencia tras realizar la prueba de azufre.
- 13) *Otros gránulos*: presentes o ausentes. Los gránulos observados más frecuentemente son de polifosfatos (gránulos Neisser+) y de polihidroxibutirato (PHB).
- 14) *Reacciones de tinción*: tinciones de Gram y de Neisser.
- 15) *Otras características*: presencia de rosetas y gonidios.

La falta de éxito en la búsqueda de una solución general para el control del *bulking* comenzaba a quedar atrás en el tiempo. Aunque con varias limitaciones, estos métodos de identificación ofrecían una herramienta sistemática que permitía tener la confianza en la identificación que no se tuvo en años anteriores. En la década de los 80 y 90 fueron numerosos los estudios realizados en distintos países del mundo para determinar la dominancia de las bacterias filamentosas en las instalaciones (tabla 1.2). Además, los manuales de Eikelboom y Jenkins han permitido la identificación, cuantificación y monitorización de bacterias filamentosas en las EDAR, haciendo posible las comparaciones de las medidas correctivas para el control de su crecimiento excesivo. En estos manuales, se encuentran descritas las relaciones entre los organismos filamentosos, su fisiología y condiciones de operación (OD, CM, EF, etc.), con el fin de definir las estrategias específicas para su control.

Tabla 1.2. Principales estudios realizados en el mundo sobre ocurrencia de bacterias filamentosas en sistemas de fangos activos.

Región/País	Principales microorganismos filamentosos	Referencias
<i>África</i>		
Sur de África	<i>M. parvicella</i> y tipo 1851, 0041/0675 y 0914	Blackbeard <i>et al.</i> (1986, 1988)
<i>Asia</i>		
Japón	Tipo 021N, NALO, <i>S. natans</i> , tipo 0041/0675 y <i>Thiothrix</i> sp.	Mino (1999)
Thailandia	Tipo 021N, 1701, 0092, 0041/0675 y NALO	Mino (1999)
<i>Europa</i>		
Republica Checa	<i>M. parvicella</i> y tipo 0092	Krhutkova <i>et al.</i> (2002)
Dinamarca	<i>M. parvicella</i> y tipo 0041/0675, 021N, 0092, 0914 y 1851	Kristensen <i>et al.</i> (1994)
Dinamarca, Alemania, Grecia y Países bajos	<i>M. parvicella</i> , <i>N. limicola</i> y tipo 0041/0675, 0092, 0803 y 0914	Eikelboom <i>et al.</i> (1998)
Francia	<i>M. parvicella</i> , <i>N. limicola</i> y tipo 0041/0675 y 0092	Pujol & Canler (1994)
Alemania	<i>M. parvicella</i> y tipo 1701, 0041/0675 y 0092	Kunst & Reins (1994)
Italia	<i>M. parvicella</i> , NALO y tipo 0092 y 0041/0675	Rossetti <i>et al.</i> (1994), Madoni <i>et al.</i> (2000)
Países Bajos	<i>M. parvicella</i> , <i>H. hydrossis</i> y tipo 0092, 021N, 1701 y 0041/0675	Eikelboom (1977, 1994), Kruit <i>et al.</i> (1994)
Reino Unido	<i>M. parvicella</i> , tipo 021N, <i>N. limicola</i> y NALO	Foot (1992), Lavender <i>et al.</i> (2003)
<i>América del Norte</i>		
USA	NALO, <i>M. parvicella</i> y tipo 1701, 021N, 0092 y 0041/0675	Strom & Jenkins (1984), Switzenbaum <i>et al.</i> (1992)
<i>Oceanía</i>		
Australia	<i>M. parvicella</i> , <i>H. hydrossis</i> y tipo 0041/0675 y 0092	Seviour <i>et al.</i> (1994)
<i>América del Sur</i>		
Argentina	Tipo 1701, <i>S. natans</i> , NALO, <i>M. parvicella</i> y tipo 0041/0675	Di Marzio (2002)

Fuente: Martins *et al.* (2004).

Las versiones más actualizadas, Eikelboom (2000) y Jenkins *et al.* (2004), corresponden también a una modificación de las claves de identificación de Eikelboom & van Buijsen (1981). Los estudios sobre incidencia de bacterias filamentosas en EDARI son algo más recientes. Así, dentro del proyecto MACOBS (*Monitoring and Control of Bulking*

Sludge through Molecular Probe Assays), Eikelboom & Geurkink (2002) identifican 40 organismos filamentosos no descritos (denominados Tipo-Ind 1, 2, etc.). Esta línea de investigación de Eikelboom culmina con la publicación de numerosos morfotipos filamentosos correspondientes a muestras procedentes de EDARI (Eikelboom, 2006).

Técnicas moleculares utilizadas para la identificación y caracterización ecofisiológica de bacterias filamentosas

Los fangos activos se caracterizan por la presencia de una compleja población microbiana, que en la mayoría de ocasiones no es posible caracterizar mediante métodos dependientes de cultivo (Wagner *et al.*, 1993). Es por ello, que actualmente se emplean una gran variedad de técnicas no basadas en cultivo para el estudio de las comunidades bacterianas presentes en estos sistemas. Entre los métodos de cultivo independiente para su detección, la técnica FISH (Amann *et al.*, 1990) se presenta como una técnica muy potente para la identificación de microorganismos en fangos activos de EDAR. En dichas instalaciones muchos organismos pueden ser identificados y cuantificados de una forma fiable con este método, el cual se describe de forma detallada en el siguiente apartado. Además, existen otros métodos moleculares, principalmente métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*). La PCR cuantitativa (q-PCR) está siendo cada vez más aplicada de forma común en muestras ambientales, aunque dicho método tiene algunos inconvenientes en comparación con la técnica FISH. Esto es debido a la posible presencia de inhibidores (ácidos húmicos) en las muestras de fangos activos con respecto a la extracción de ácidos nucleicos, y también el hecho de que los métodos basados en PCR no cuantifican células microbianas, aunque miden un número de copias de genes marcadores.

En contraste con otros métodos, mediante el uso de la técnica FISH es posible la identificación de microorganismos en comunidades complejas con alto grado de especificidad, aportando información que otros métodos no pueden ofrecer acerca de la morfología, cantidad y distribución espacial en el medio. Por ello, la técnica FISH está siendo por el momento el método elegido para la detección y cuantificación de microorganismos en las EDAR.

La técnica FISH puede combinarse con otros métodos para detectar importantes rasgos ecofisiológicos a nivel celular. La microautoradiografía (MAR, *microautoradiography*) se considera una técnica potente para estudiar directamente la utilización de sustratos marcados radioactivamente bajo condiciones de incubación definidas en ambientes complejos (Andreasen & Nielsen, 1997). La combinación MAR-FISH permite el vínculo entre identidad y capacidad fisiológica del organismo (Lee *et al.*, 1999). Variaciones del protocolo MAR, como MAR cuantitativa y HetCO₂-MAR, permiten la cuantificación del sustrato almacenado (Hesselsoe *et al.*, 2005). Por otro lado, el compuesto redox cloruro de 5-ciano-2,3-ditoliltetrazolio (CTC), el cual es fluorescente después de la reducción, puede utilizarse para mostrar la actividad respiratoria en células individuales (Nielsen *et al.*, 2003a), mientras que la tinción de negro Sudán o azul Nilo detectan si se sintetizan de forma intracelular PHA (u otros compuestos lipídicos

de almacenamiento) después de incubación con sustratos individuales bajo condiciones definidas, y posteriormente cuantificados sus niveles utilizando un software de análisis de imagen (Kragelund *et al.*, 2005, 2006). Las inclusiones de polifosfatos son fácilmente detectadas a través de la tinción de Neisser o 4',6-diamino-2-fenilindol (Crocetti *et al.*, 2000). Las propiedades de superficie de las células pueden ser visualizadas a través de análisis de adherencia de microesferas a la célula (MAC, *microsphere adhesion to cells*) (Zita & Hermansson, 1997a, b). Dicho método utiliza pequeñas microesferas hidrofóbicas (0,01 mm), las cuales se adhieren a otras superficies hidrofóbicas en poblaciones del fango activo que incluyen bacterias filamentosas, especialmente aquellas relacionadas con los episodios de *foaming* (Nielsen *et al.*, 2001; Kragelund *et al.*, 2007a, b). La presencia de componentes específicos en su superficie celular, como fibrillas amiloides, pueden ser detectadas mediante anticuerpos apropiados (Larsen *et al.*, 2006, 2008), y la actividad exoenzimática puede ser detectada aplicando métodos con el sustrato enzimáticos marcados con fluoróforos (sustratos-ELF) (*enzyme-labelled fluorescence*) (Nielsen *et al.*, 2002).

Identificación de bacterias filamentosas mediante la técnica FISH

Las técnicas moleculares más utilizadas en estudios de diversidad microbiana a nivel genético son aquellas basadas en la amplificación y secuenciación del gen 16S, que codifica para la subunidad ribosómica bacteriana (siendo su equivalente en eucariotas la subunidad 18S rRNA). El gen que codifica para el RNA ribosómico 16S es el más utilizado en estudios de filogenia y taxonomía bacterianos. Su aplicación como “cronómetro molecular” fue propuesta por Carl Woese a principios de la década de 1970. Aunque existen cronómetros moleculares alternativos al 16S rRNA, hasta el momento ninguno ha conseguido desplazarle, pues este presenta una serie de características en base a las cuales fue considerado como cronómetro molecular definitivo (Woese, 1987):

- Se trata de una molécula presente en todas las bacterias actuales, siendo una diana universal para su identificación.
- Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.
- Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta como para aportar información acerca de todos los procariotas y, junto con las variaciones en los 16S rRNA, a lo largo de toda la escala evolutiva. Los rRNA con esta subunidad (que es la pequeña entre los procariotas, siendo las subunidades 23S y 5S las que conforman la subunidad mayor) contienen, sin embargo, suficiente variabilidad para diferenciar no solo los organismos más alejados, sino también los más próximos.
- El tamaño del 16S rRNA es de aproximadamente 1500 nucleótidos, siendo un tamaño adecuado como para proporcionar información suficiente.

- La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.
- Dado la relativa facilidad de secuenciar el gen 16S rRNA, se han creado bases de datos amplias.

La técnica FISH se ha convertido en uno de los métodos más ampliamente utilizados cuando se estudian los microorganismos directamente en sistemas complejos sin aislamiento y cultivo previo. Dicha técnica hace posible dentro de un espacio corto de tiempo obtener información de la identidad filogenética directamente de las células de la muestra, y puesto que también mantiene la morfología de las células, también proporciona información de la distribución espacial, así como del número de organismos identificados.

La primera identificación de hibridación *in situ* fue aplicada usando oligonucleótidos marcados radiactivamente, los cuales tenían una resolución microscópica limitada y necesitaban autorradiografía para la visualización. El uso de la técnica FISH fue por primera vez descrito en 1989 (DeLong *et al.*, 1989), y desde entonces se ha convertido en el método elegido para examinar las comunidades microbianas tanto en sistemas naturales como artificiales.

Esta técnica se basa en la aplicación del proceso de hibridación que se produce entre secuencias complementarias de material genético. La doble hélice de DNA puede ser desnaturalizada, es decir, se desenrolla y se separa de las hebras que la forman mediante la aplicación de una elevada temperatura. Cuando la temperatura disminuye, las hebras se vuelven a unir por sus bases complementarias. Por tanto, una secuencia de DNA se puede unir a otra de DNA o también a una secuencia de RNA complementaria generando un híbrido: DNA-DNA o DNA-RNA. En el caso de la técnica FISH, se basa en la hibridación DNA-RNA de una región del gen 16S o 23S. Para ello, emplea secuencias de 15-25 nucleótidos que se unirán específicamente de forma complementaria formando un híbrido con el rRNA de los organismos diana bajo condiciones específicas. Dichas secuencias de DNA (sondas moleculares de oligonucleótidos) están marcadas normalmente en el extremo 5' con sustancias fluorescentes llamadas fluoróforos, que permiten la detección de las células diana mediante el uso de un microscopio de epifluorescencia o confocal láser. El elevado número de moléculas de rRNA (10^3 - 10^5) es una ventaja en la aplicación de esta técnica al aumentar su sensibilidad (Amann, 1994). Las sondas FISH, además de ofrecer una elevada sensibilidad, deben de ofrecer también una elevada especificidad. Estas pueden ser diseñadas en función de la especificidad deseada, ajustándose a los diferentes niveles taxonómicos, como son: dominio, filo, clase, familia, género o especie para la identificación de las bacterias en sus diferentes medios naturales (Amann *et al.*, 1995). La sensibilidad se refiere al nivel de fluorescencia suficiente para distinguir la célula hibridada de la fluorescencia de fondo, mientras que por especificidad se entiende la capacidad de distinguir las células diana de las que no lo son y que podrían dar una señal de hibridación falsa.

La parte más crítica de la técnica FISH es el diseño de las sondas, que deben ser lo suficientemente específicas para unirse únicamente a la bacteria que se pretende identificar en presencia de otras, en muchos casos con moléculas de rRNA muy homólogas. Las condiciones de hibridación son factores clave para que se mantengan los dos requisitos de especificidad y sensibilidad anteriormente mencionados. Para asegurar la especificidad de las sondas, los dos parámetros determinantes van a ser la temperatura y concentración de formamida en el tampón de hibridación. En la mayoría de protocolos la temperatura de hibridación se mantiene constante, siendo la concentración de formamida la que establece la especificidad de la sonda. La formamida hace que disminuya la temperatura de unión de las sondas mediante el debilitamiento de los puentes de hidrógeno. Este compuesto disminuye la temperatura de fusión DNA-RNA en 0,72 °C por cada 1% de formamida utilizada, permitiendo realizar la hibridación entre 30 y 50 °C. Otros aspectos a tener en cuenta en esta técnica son la permeabilidad celular y el contenido en ribosomas, debido a que la sonda hibrida con el RNA ribosómico.

Tal cual se ha comentado anteriormente, para esta técnica se utiliza microscopía de epifluorescencia. Esta es una variación de la microscopía óptica, donde la luz emitida (tanto visible como ultravioleta) no atraviesa la muestra estudiada, sino que incide sobre ella de modo que la misma lente ilumina y recibe la luz emitida por la muestra. La imagen observada es el resultado de la radiación electromagnética emitida por las moléculas que han absorbido la excitación primaria y la vuelven a emitir con mayor longitud de onda. Para dejar pasar sólo la emisión secundaria deseada se deben colocar filtros apropiados debajo del condensador y encima del objetivo. Para la observación, la selección de un adecuado conjunto de filtros es de vital importancia. Existe un gran número de juegos de filtros de excitación y de emisión para los diferentes fluoróforos, inclusive conjuntos que permiten la observación simultánea de dos fluoróforos.

A continuación se resumen las principales ventajas y limitaciones de la técnica FISH respecto a otras.

➤ Ventajas:

- No necesita el cultivo previo de la bacteria ni la extracción de los ácidos nucleicos.
- La hibridación inespecífica con otros microorganismos presentes en la muestra no es habitual, no dándose falsos positivos.
- No parecen existir sustancias inhibidoras que interfieren en la reacción de hibridación.
- Puede determinar directamente la abundancia de los microorganismos detectados.
- La especificidad de las sondas puede ser ajustada a diferentes niveles taxonómicos, como son: dominio, filo, clase, familia, género y especie para la identificación de las bacterias.

- Las preparaciones pueden conservarse durante mucho tiempo (años).
- Puede utilizarse junto con la tinción DAPI para determinar si las células están vivas o no, muy útil para la monitorización del estado de la comunidad microbiana durante la adición de biocidas en el control del *bulking* y el *foaming*.

➤ Principales limitaciones

- La principal limitación es la sensibilidad, que depende del número de ribosomas existentes, de la penetración de la propia sonda y de la matriz donde estemos hibridando, ya que en muchos casos es necesario un tratamiento previo.
- Otra limitación es el medio utilizado para el crecimiento bacteriano (en caso de utilizar cultivos de microorganismos), los métodos de fijación de la bacteria y los agentes utilizados para embeber la muestra antes de visualizarla, ejercen una influencia importante en la intensidad de la señal.

Estado taxonómico actual de bacterias filamentosas presentes en fangos activos

El crecimiento excesivo de bacterias filamentosas en EDAR ha causado graves problemas operacionales durante muchos años. Desde la década de 1970, son numerosos los estudios que han intentado desarrollar métodos adecuados para controlar estos organismos filamentosos basados en una mejor comprensión de su identidad, fisiología y ecología. Se han descrito más de 30 morfotipos filamentosos diferentes en sistemas de fangos activos tratando principalmente ARU (Eikelboom, 1975, 2000), y muchos más que se encuentran entre las comunidades de EDARI (Eikelboom & Geurkink, 2002; Eikelboom, 2006).

La mayoría de morfotipos filamentosos de Eikelboom no han sido mencionados o descritos en “Bergey’s Manual of Systematic Bacterology” o “The Prokaryotes” (Dworkin *et al.*, 2006), referencias ampliamente utilizadas en la identificación de bacterias. Entre las pocas excepciones se encuentran *Sphaerotilus natans*, *Beggiatoa* sp., *Haliscomenobacter hydrossis*, *Thiothrix nivea*, *Candidatus* ‘Nostocoida limicola’ (*Tetrasphaera*), *Gordonia* sp., *Skermania piniformis* y otros géneros del grupo Mycolata. En los últimos años, filamentosos como *Meganema perideroides* (Thomsen *et al.*, 2006a) han sido descritos y nombrados formalmente en la IJSEM (*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*) y depositadas las cepas aisladas en colecciones de cultivos. Por otro lado, tampoco los morfotipos de Eikelboom han recibido nombres válidos que siguieran el Código Internacional de Nomenclatura en su estudio original. A pesar de ello, han sido ampliamente utilizados en artículos científicos y en la monitorización de las EDAR, a través de los tipos numéricos originales (tipo 1851, tipo 021N, etc.) del sistema de Eikelboom

(1975). Esta denominación no permite una comunicación efectiva, pudiendo conducir a confusiones respecto a la bacteria la cual se está discutiendo.

Con el desarrollo de métodos moleculares de cultivo independiente, el conocimiento de la identificación de filamentos y otras poblaciones en fangos activos ha aumentado de forma considerable. La aplicación de una variedad de métodos moleculares, especialmente la técnica FISH, ha aportado multitud de datos. Sin embargo, como la mayoría de estos organismos no son cultivables, quedan por completar la fisiología y ecología de muchos de ellos. Debido al escaso conocimiento de su taxonomía, hacen referencia a filotipos y no a especies.

Un gran número de morfotipos filamentosos han sido identificados tradicionalmente en las EDAR a través de sus características morfológicas utilizando los manuales de Eikelboom (2000) y Jenkins *et al.* (2004), utilizando escalas ordinales subjetivas para la valoración de sus abundancias. Sin embargo, actualmente sólo unas pocas especies pueden ser identificadas de forma fiable basándose en dichas características, a través de técnicas convencionales, las cuales incluyen *Candidatus* 'Microthrix parvicella', *Thiothrix* sp. y Nocardioformes. Por tanto, gran parte de las primeras informaciones publicadas sobre microbiología de los fangos activos reviste un interés más bien histórico y debe ser contemplado como tal (Nielsen *et al.*, 2009), utilizándose para su identificación la técnica FISH siempre que sea posible. Las secuencias disponibles del gen 16S rRNA indican que las principales bacterias filamentosas se engloban al menos dentro de siete filobacterianos (Figura 1.11) (Nielsen *et al.*, 2009a): *Proteobacteria* (clases *Alfa*, *Beta* y *Gamma*), *Chloroflexi*, *Planctomycetales*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Candidatus* división TM7.

Los intentos en identificar los filamentos, especialmente aquellos cuyas sondas FISH no están disponibles, indudablemente se deberá de confiar en los manuales de referencia de Eikelboom (2000, 2006) y Jenkins *et al.* (2004). A pesar de ser manuales muy extendidos, deben utilizarse con cierta precaución. Un ejemplo de ello es la decisión unilateral y sin justificación experimental que el morfotipo *Nostocoida limicola* II debería ser considerado como un sinónimo de *Nostocoida limicola* III (Eikelboom, 2000). Los dos manuales de referencia no siempre están de acuerdo, presentando algunas veces descripciones confusas para un mismo morfotipo. Tales discrepancias, que incluyen variaciones en las dimensiones del filamento y resultados a ciertas reacciones de tinción, pueden surgir debido a que los organismos descritos son diferentes. Ambos manuales también fallan en describir muchos de los filamentos caracterizados recientemente. Esto es debido a que a menudo son utilizados criterios morfológicos como indicadores fiables de parentesco entre organismos, un problema agravado por algunos capaces de revertir a formas unicelulares como una característica regular de sus ciclos de vida (Ramothokang *et al.*, 2006; Seviour *et al.*, 1997). Por tanto, filamentos que a priori parecen el mismo morfotipo pueden ser distintos organismos, incluso ante la observación de técnicos con mucha experiencia. Filamentos procedentes de diferentes EDAR, particularmente en distintos países, pueden cambiar fácilmente sus características morfológicas descritas en los manuales, incluso cepas dentro de cada tipo morfológico pueden variar considerablemente en su filogenia y ecofisiología.

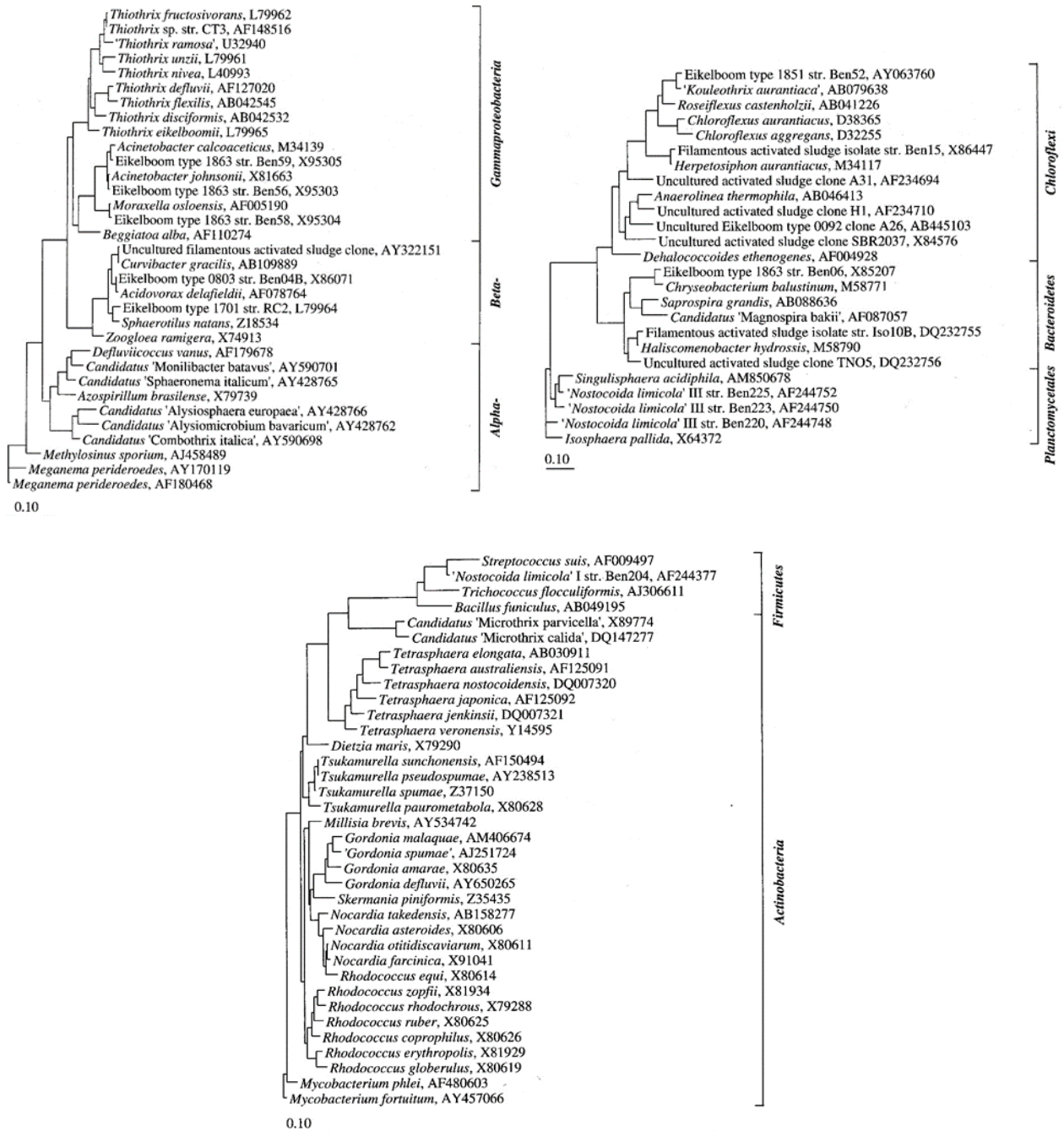


Figura 1.11. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen 16S rRNA. (a) Bacterias filamentosas del filo *Proteobacteria* y relación de secuencias. (b) Bacterias filamentosas de los fila *Chloroflexi*, *Planctomycetales*, *Bacteroidetes* y relación de secuencias. (c) Bacterias filamentosas Gram positivas de los fila *Firmicutes* y *Actinobacteria* y relación de secuencias. Todas las secuencias fueron inferiores a 1000 bp de longitud. La escala (barra) corresponde a 0,1 sustituciones por posición de nucleótido. Fuente: Nielsen *et al.* (2009a).

A continuación se resumen las ventajas y desventajas, desde distintos puntos de vista, de los métodos de identificación basados en técnicas convencionales y FISH, llegando a la conclusión que ninguno de los dos es perfecto (Müller *et al.*, 2007).

Técnica convencional de identificación

➤ Ventajas:

- Relativamente económica, ya que solo se requiere una buena calidad de microscopio con óptica de contraste de fases.
- Rápida con una práctica regular y con un examen periódico de una planta individual permite identificar los filamentos con confianza, siendo cualquier cambio en su composición fácilmente reconocible.
- Existen abundantes cursos en muchos países que tratan estos métodos de identificación.

➤ Desventajas:

- Se basa en la morfología del filamento, por ello solo se reconocen morfotipos.
- Algunas bacterias filamentosas (por ejemplo los morfotipos 0961, 1701, 0092 y *S. natans*) pueden cambiar morfológicamente en respuesta a cambios ambientales (Buali *et al.*, 1989; Richard *et al.*, 1985; Seviour *et al.*, 1997).
- Diferentes especies pueden parecer la misma y variar de forma considerable fisiológicamente y taxonómicamente. Por ejemplo, diversos estudios han revelado que distintos morfotipos de *Nostocoida limicola* se encuentran afiliados a la clase *Alfaproteobacteria* (Snaidr *et al.*, 2002), filo *Chloroflexi* (Schade *et al.*, 2002), *Firmicutes* (Liu *et al.*, 2000), *Planctomycetales* (Liu *et al.*, 2001b) y *Actinobacteria* (Blackall *et al.*, 2000; Liu & Seviour, 2001).
- Puede existir una elevada población de filamentos que no permita distinguir unas especies de otras, y los situados intracelularmente pueden pasar desapercibidos (Andujar *et al.*, 2013).

Técnica FISH

➤ Ventajas:

- Las sondas pueden diseñarse a distintos niveles taxnómicos, desde nivel de especie hasta dominio.
- Son independientes de la morfología del organismo, identificándose tanto filamentos como células aisladas.
- Revelan si cada morfotipo filamentoso se corresponde con uno o varios filotipos bacterianos, los cuales serían indistinguibles con microscopía convencional.

➤ Desventajas:

- No existen sondas para todas las bacterias filamentosas.
- Las sondas en ocasiones no pueden acceder a los ribosomas, bien por problemas de permeabilidad celular o por limitaciones de la estructura secundaria de la sonda, dando falsos negativos.
- Las células necesitan estar metabólicamente activas con altos niveles de ribosomas para dar respuestas positivas, por ello los falsos negativos también son posibles.
- Las bases de datos de secuencias del gen rRNA disponibles para el diseño de sondas están incompletas, por tanto, el riesgo de falsos positivos de poblaciones cuyas secuencias de 16S rRNA no han sido depositadas es posible.
- Cada análisis FISH solo detectará uno o pocos filotipos, siendo necesario el rRNA basado en microchips de DNA o análisis metagenómico para los estudios completos de identificación de la comunidad.
- Requiere equipamiento más caro y personal técnico especializado.

1.8.3 Problemas de separación del fango activo

El proceso de fangos activos depende en su última etapa de la capacidad de separación de la biomasa en el clarificador secundario, dejando un clarificado libre de turbidez y sólidos en suspensión.

Muchos de los problemas de separación de los sólidos del fango activado se encuentran relacionados con la naturaleza del flóculo. En un fango activado hay un amplio margen de tamaños de partículas, desde bacterias individuales cuyo rango de tamaño se encuentra aproximadamente entre 0,5 y 5 μm , hasta grandes agregados con

dimensiones superiores a 1 mm. Esta característica se encuentra directamente relacionada con la condición de equilibrio de los microorganismos que configuran el flóculo. En caso de desequilibrio, se presentan seis problemas de separación de sólidos causados por fenómenos físicos y microbiológicos (tabla 1.3).

Tabla 1.3. Problemas asociados con la separación de la biomasa del fango activo en los clarificadores.

Problema	Posible causa	Efecto
Crecimiento disperso	Fallo en la microestructura del flóculo. No se produce la biofloculación. Los microorganismos están dispersos en pequeños agregados o como células aisladas y no forman flóculos.	Efluente turbio y los sólidos no sedimentan.
<i>Bulking</i> viscoso (no filamentoso)	Fallo en la microestructura del flóculo originado por un exceso de exopolisacáridos de origen microbiano. Es frecuente en EDARI cuando se dan condiciones de deficiencia nutricional. Incorrectamente denominado <i>bulking</i> “zoogleal”.	Fango de consistencia viscosa. Problemas de compactación y sedimentación, de modo que en casos severos no se separan los sólidos y se pierde fango en el efluente tratado.
Flóculo “punta de alfiler” (<i>pinpoint floc</i>)	Fallo en la macroestructura del flóculo por falta o baja presencia de bacterias filamentosas. Los flóculos tienen una consistencia débil y los fragmentos de pequeño tamaño sedimentan mal. Es común encontrarlo en EDAR que operan con baja CM.	Turbidez en el efluente y bajo índice volumétrico del fango (IVF).
<i>Bulking</i> filamentoso	Fallo en la macroestructura del flóculo por exceso de bacterias filamentosas que se extienden fuera del flóculo formando puentes interfoculares o desarrollando flóculos con una estructura disgregada.	Compactación y sedimentación del fango activo muy deficiente. Elevados valores del IVF. En casos severos pueden escapar los SSLM con el efluente.
Manto ascendente (flotación de fangos)	Formación de N ₂ por desnitrificación dada en el decantador secundario. Este gas se adhiere a los flóculos y los arrastra hasta la superficie del decantador. Los elevados TRH del decantador favorecen este problema.	La superficie de los clarificadores se cubre por efecto del fango flotado.
<i>Foaming</i> (espumas biológicas)	Probablemente causado por bacterias con superficie celular hidrofóbica, asociándose burbujas de aire y partículas del flóculo. Bacterias pertenecientes al grupo Mycolata y <i>Candidatus</i> ‘ <i>Microthrix parvicella</i> ’ suelen ser los principales responsables.	Formación de espumas estables con aspecto céreo y de color marrón en la superficie del decantador secundario, que no permiten la compactación ni sedimentación completa del fango activo. Puede perderse biomasa activa con el efluente tratado.

Fuente: Jenkins *et al.* (2004) y Wanner (2002).

En los siguientes apartados se profundiza en aquellos problemas de separación originados por un crecimiento excesivo de bacterias filamentosas, y que causan serios problemas operacionales en las EDAR: los fenómenos de *bulking* o hinchazón y *foaming* o espuma.

Foaming

Uno de los mayores problemas de separación de sólidos en plantas de agua residual es el *foaming*, denominado como la formación de una capa de espuma estable, viscosa y de color chocolate que aparece en la superficie del reactor biológico y clarificadores secundarios (Jenkins *et al.*, 2004) (figura 1.12). Tal cual se ha señalado anteriormente, la

primera vez que se documentó un episodio de *foaming* causado por bacterias Gram positivas fue en 1969, atribuidas posteriormente en 1974 a miembros del género *Nocardia*, concretamente *N. amarae* y *N. rhodochrous* (Lechevalier & Lechevalier, 1974), y por ello; denominadas “*Nocardia Foams*”. Actualmente el empleo de dicho término es incorrecto por varias razones:

- Se ha demostrado y se piensa que otros organismos son capaces de formar *foaming* (de los Reyes, 2010).
- Los estudios del grupo Mycolata pertenecientes al filo *Actinobacteria* han conducido a grandes cambios en su clasificación, entre ellos, se incluye la transferencia de *Nocardia rhodochrous* al género *Rhodococcus*. La conocida formadora de *foaming* *Nocardia amarae*, ha sido reclasificada como *Gordona amarae* (Klatte *et al.*, 1994; Goodfellow *et al.*, 1994; Ruimy *et al.*, 1994) y posteriormente nombrada como *Gordonia* (nombre etimológicamente más correcto) (Stackebrandt *et al.*, 1997).



Figura 1.12. Problemas de *foaming* en planta. Escape de espumas biológicas del reactor biológico (a) y del clarificador secundario (b). Autor: Andrés Zornoza.

Ocurrencia y primeros estudios. Los problemas de *foaming* han sido objeto de discusión a partir de los resultados de trabajos realizados en numerosas EDAR. En 1982, se demostró que en el 31% de un total de 27 EDAR de 35 estados aparecía *Nocardia* (Richard, 1989), la cual fue identificada como el segundo microorganismo filamentosos más abundante. Un estudio en 1984 de 78 laboratorios de plantas prototipo y piloto de 20 estados también identificó a *Nocardia* como el segundo filamento más predominante (Strom & Jenkis, 1984). Aquellos especialmente con problemas de *foaming* fueron estudiados, encontrando en América que de un total de 114 EDAR, el 66% habían experimentado algún episodio de *foaming* (Pitt & Jenkins, 1990). En Illinois, 30 de 31 plantas (97%) habían espumado en un momento u otro (de los Reyes *et al.*, 2002), mientras en el norte de Carolina, 88% de 47 plantas padecían problemas de *foaming* (Keith, 2002).

El *foaming* es un fenómeno que ocurre en todo el mundo. De 129 plantas muestreadas en 1988 en Queensland, New South Wales y Victoria (Australia), 66 formaron espumas durante el periodo de muestreo (Seviour *et al.*, 1990). Más tarde, de un total de 65 EDAR en Australia, Seviour *et al.* (1994) registraron un total de 53 episodios de *bulking*, mientras que 44% producían espumas. Blackall *et al.* (1991) mostró que de 46 plantas en Queensland, solo el 8% nunca habían experimentado *foaming*. Un estudio de 39 plantas en Italia también reveló la predominancia de *bulking* y *foaming* (Rosseti *et al.*, 1994), mientras que un estudio posterior mostró que 84 de 167 plantas tuvieron problemas de *foaming* (Madoni *et al.*, 2000). Un estudio exhaustivo de 6013 plantas en Francia, representando el 75% de plantas que estaban operando en aquel momento, revelaron que 1192 plantas fueron afectadas por *foaming* (Pujol *et al.*, 1991), mientras en 111 plantas del sur de África, los episodios de *foaming* fueron registrados en el 68% de ellas (Blackbeard *et al.*, 1986). En los países bajos, de 70 plantas con sistemas carrusel, el 48% y 17% experimentaban *foaming* en primavera y otoño, respectivamente (Eikelboom, 1994), mientras el 50% de plantas de EBPR en Dinamarca tuvieron problemas de *foaming* (Wanner, 1994b). Por otro lado, un trabajo similar en la República Checa realizado por Wanner *et al.* (1998) concluyó que los incidentes de *foaming* fueron en aumento. También existen referencias de problemas de *foaming* en Japón (Hiraoka & Tsumura, 1984; Mori *et al.*, 1992) y Suecia (Holmstrom *et al.*, 1996), Austria (Franz & Matsche, 1994), Alemania y Suiza (Lemmer & Kroppenstedt, 1984), Arabia Saudí (Goddard & Forster, 1987b), Hong Kong (Chua & Le, 1994) y en el Reino Unido (Goddard & Forster, 1986).

Mecanismos de formación del *foaming*. Han sido propuestos varios mecanismos respecto a la formación del *foaming*. La morfología ramificada de las bacterias nocardioformes ha sido observada formando una “red” entre los flóculos, atrapando gotas de aceites y grasas y burbujas de gas, originando que el fango flote a la superficie (Pipes, 1978) (figura 1.13a). Otra hipótesis sugiere que el alto contenido lipídico de las células de *Candidatus* ‘M. parvicella’ y bacterias pertenecientes al grupo Mycolata (actinomicetos que contienen ácidos micólicos) (Hao *et al.*, 1988; Soddell & Seviour, 1990), conducen a una menor densidad, originando que tanto las grasas como el fango floten (figura 1.13b). Lemmer (1986) calculó que con un promedio de densidad de 0,9-0,95 g/cm³ para aceites y grasas y un promedio de 1,8 g/cm³ para fango seco, aproximadamente el 85% del peso seco del fango como aceites y grasas, se produciría la flotación, haciendo poco probable esta hipótesis. Las teorías actuales indican que los organismos que causan *foaming* se enriquecen de forma selectiva en la espuma (Blackall & Marshall, 1989). Distintos autores han descrito los mecanismos de su formación (Soddell & Seviour, 1990; Jenkins *et al.*, 1993). La estabilidad de la espuma en fangos activos se ve favorecida por la hidrofobicidad que confieren los filamentos a las partículas sólidas. Dichos filamentos poseen una superficie hidrofóbica celular, originando una espuma que consiste en tres fases. Estas partículas deben ser de pequeño tamaño (menos de 300 µm) para que puedan ser elevadas por flotación a través de las burbujas de aire del sistema de aireación (Soddell & Seviour, 1990). Las partículas hidrofóbicas también pueden crear puentes entre dos burbujas de aire. Por lo tanto, para la formación de una espuma estable, son varios los factores que deben estar presentes: burbujas de gas, partículas hidrofóbicas y surfactantes de origen biológico.

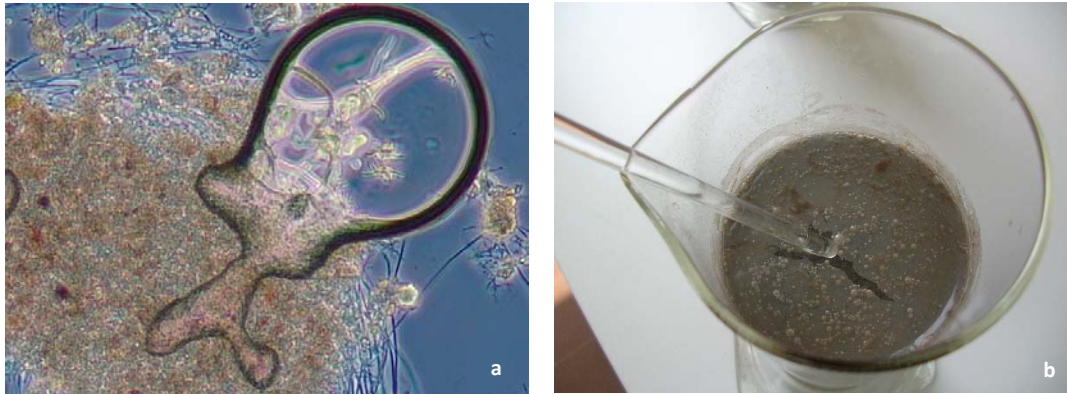


Figura 1.13. Mecanismo de formación del *foaming*. (a) Fóculo atrapando burbujas de gas. Contraste de fases, 100x. (b) Flotación de grasas y flocos en el ensayo de la V30. Autor: Andrés Zornoza.

El análisis microscópico de espumas de fangos activos muestra que el *foaming* consiste en burbujas de aire sujetas en una densa matriz de microorganismos filamentosos, en cuyo alrededor se encuentran burbujas individuales que contienen material celular (Foot *et al.*, 1993). La formación de burbujas se ve favorecida por los sistemas de agitación del reactor biológico. Además, se ha estudiado también la relación entre el *foaming* y el tamaño de la burbuja. Dicho tamaño no viene determinado únicamente por el método de aireación empleado, sino que depende a su vez de factores físicos como la viscosidad y la tensión superficial del licor mezcla. Otros gases, como el CO₂, N₂ y H₂S, también se encuentran presentes en el licor mezcla como resultado del metabolismo de la microbiota presente, pero el aumento producido es insignificante comparado con el ocasionado por la aireación, no contribuyendo significativamente a la formación de espumas (Lemmer & Bauman, 1988a, b).

La mayoría de los microorganismos productores de espumas contienen grandes cantidades de material lipídico hidrofóbico en sus células. El 35% del peso seco de “*M. parvicella*” es material lipídico y los actinomicetos que contienen ácidos micólicos (Mycolata) tienen grandes cantidades de estos compuestos unidos covalentemente a azúcares en sus paredes celulares, creando así una superficie cerosa en las células (Stratton *et al.*, 1998). Algunos estudios han demostrado que las bacterias que contienen ácidos micólicos eran más hidrofóbicas que las bacterias que carecen de ellos (Bendinger *et al.*, 1993). Además, un aumento de la longitud de la cadena de ácidos micólicos se relaciona con una mayor hidrofobicidad, aunque los efectos opuestos de otros compuestos superficiales de la célula (p.ej. glicopeptidolípidos, proteínas, exopolisacáridos débilmente hidrofóbicos, etc.) generan un efecto menor de lo esperado. En algunos casos, el ácido urónico se ha relacionado con la hidrofobicidad (Kerley & Forster, 1995). Sin embargo, en otros estudios no se ha encontrado ninguna relación entre los ácidos micólicos y la hidrofobicidad superficial de la célula (Stratton *et al.*, 1997, 2002). Cabe destacar que la variedad de métodos para determinar la

hidrofobicidad superficial de la célula puedan haber llevado a dichas diferencias en los resultados de los diversos estudios.

Un tensoactivo es una sustancia que, cuando se presenta en bajas concentraciones en un sistema, tiene la propiedad de reducir la tensión superficial del agua. Los agentes tensoactivos también están presentes en el sistema biológico, ya que los organismos relacionados con dichos episodios pueden producir biosurfactantes (Lechevalier, 1975; Cairns *et al.*, 1982), especialmente cuando crecen en medios que contienen hidrocarburos (Soddell & Seviour, 1990). La participación de las células y biosurfactantes extracelulares en la formación y estabilización del *foaming* fue demostrada en el cultivo de *Gordonia amarae* SC1 (Iwahori *et al.*, 2001). El licor mezcla proveniente de plantas con problemas de *foaming* muestra menor tensión superficial que el del resto de plantas sin espumas, sugiriendo que grandes cantidades de tensoactivos se encuentran presentes en las plantas con *foaming* (Goddard & Forster, 1991).

Problemas asociados con el *foaming*. La ocurrencia global de microorganismos filamentosos responsables de episodios de *foaming* ha causado gran atención en las pasadas dos décadas. La capa de espuma puede llegar a tener más de un metro de espesor (Goddard & Forster, 1987a, b) y pueden llegar a acumularse en las áreas circundantes al reactor, originando zonas muy resbaladizas y peligrosas y evitando el acceso a equipos (Jenkins *et al.*, 1993). Los problemas originados por formación de espumas biológicas han sido descritos por algunos autores (Blackall *et al.*, 1985):

- Servicios y trabajos de limpieza adicional por parte de los operadores de EDAR.
- Mal funcionamiento de los sistemas de eliminación de flotantes.
- Reducción de la transferencia del oxígeno de los sistemas de aireación mecánicos. Se origina una capa superficial de espumas que no permite la transferencia del oxígeno entre el agua y la atmósfera, lo que disminuye la concentración de oxígeno en los tanques. Esto puede llegar a crear situaciones de anoxia, sobre todo si la capa es muy espesa y de naturaleza hidrofóbica.
- Ciertos microorganismos descritos como formadores de espumas como *Nocardia asteroides* y *Rhodococcus equi*, son patógenos oportunistas, siendo los aerosoles de estos organismos potencialmente peligrosos para la salud (de los Reyes, 2010).
- Las espumas son claramente un problema estético, causando malos olores principalmente en verano.
- Las espumas pueden alcanzar los clarificadores secundarios, de modo que reducen la calidad del efluente tratado (aumento de SST y DBO₅) al escapar con el clarificado.

Algunos autores han señalado que la acumulación en el tratamiento secundario de grandes cantidades de espumas puede limitar la entrada del agua residual al reactor biológico (Jenkins *et al.*, 1993). Además, durante los episodios de espumación el control del proceso se hace muy difícil, puesto que puede llegar a acumularse en superficie del reactor hasta el 20% del total de fangos (Hao *et al.*, 1988). En sistemas cerrados de adición de oxígeno puro, las espumas pueden llegar a entrar dentro de los compresores creando un peligro de incendio (Hanson *et al.*, 1992). Por otro lado, las espumas también pueden causar problemas en digestores anaeróbicos que tratan los fangos en exceso, debido a la obstrucción de los equipos de mezcla de gases, inversión del perfil de sólidos, atrapamiento de gases y reducción del potencial de calentamiento del digestor (Jenkins *et al.*, 1993). A su vez, las espumas también pueden llegar a ocupar volúmenes significativos (hasta la mitad del volumen total) en los digestores anaeróbicos (Hernández, 1994).

Microorganismos relacionados con episodios de *foaming*. Es muy importante que aquellos microorganismos que causan espumas sean identificados, con el fin de poder estudiar su crecimiento y ecofisiología. A su vez, dicha comprensión permitirá la identificación de las causas de operación en planta, así como los métodos más adecuados para su control. Los tres métodos usados para identificar microorganismos en las espumas son: microscopía, aislamiento e identificación en cultivos puro y métodos moleculares (de los Reyes, 2010).

Los primeros estudios de comunidades microbianas en fangos activos fueron realizados principalmente a través del examen microscópico basado en técnicas convencionales (Eikelboom, 1975; Eikelboom & van Buijsen, 1981). Durante los años 80 dichos análisis microscópicos mostraron la dominancia de microorganismos pertenecientes al filo *Actinoacteria*, con características Gram positivas y células ramificadas con ángulos rectos. Desde entonces, otros organismos han sido identificados como dominantes en las espumas biológicas, encontrándose durante los estudios de plantas de todo el mundo (tabla 1.4.).

Factores que afectan al crecimiento de microorganismos productores de espumas. A pesar de que los microorganismos formadores de espumas, grupo Mycolata y *Candidatus* 'M. parvicella', están considerados de crecimiento lento, de algún modo logran competir por los nutrientes y producir grandes cantidades de biomasa en las plantas de fangos activos. Los factores que afectan al crecimiento son en términos generales: requerimiento nutricional, requisitos de oxígeno, temperatura, pH y EF.

Tabla 1.4. Bacterias identificadas en espumas de fangos activos por microscopía convencional en distintos estudios.

NALO/GALO (<i>Nocardia</i> sp y <i>Gordonia</i> sp.)	La mayoría Gram positivas, ramificaciones verdaderas en ángulo recto han sido identificadas como <i>Nocardia</i> o NALO (<i>Nocardia amarae</i> -like organisms). Algunos estudios han descrito estos morfotipos como GALO (<i>Gordonia amarae</i> -like organisms), después de la transferencia de <i>N. amarae</i> al género <i>Gordonia</i> . La designación NALO y GALO se utiliza desde que <i>Rhodococcus</i> , mycobacterias y otros Mycolata son capaces de compartir una morfología similar. El mejor término para referirse a todos ellos es Mycolata, los cuales incluyen miembros del filo <i>Actinobacteria</i> que contienen ácidos micólicos, clasificados en el suborden <i>Corynebacterinae</i> .
<i>Candidatus</i> 'Microthrix parvicella'	Mayor causa de <i>foaming</i> en Europa, Australia y Sur de África. Se ha observado muy común en América, causando <i>bulking</i> y <i>foaming</i> .
<i>Skermania piniformis</i>	Actinomiceto que contiene ácidos micólicos con la característica de ramificaciones en ángulo agudo. Originalmente se llamaba PTLO (pine tree-like organisms). Ha sido observado en Australia y Europa, y ocasionalmente en América.
Actinomicetos	Seviour <i>et al.</i> (1994) los define como Gram positivos ramificados sin los modelos de ramificación distintivos de GALO/NALO y <i>Skermania</i> .
Tipo 0092	Organismo dominante encontrado en África del Sur. Otro trabajo plantea dudas sobre si realmente es un formador de espumas.
Tipo 0041 y 0675	Tipo 0675 ha sido observado en estudios realizados en Francia y Alemania. Algunos estudios no distinguen entre los morfotipos 0041/0675.
<i>Nostocopida limicola</i> II	Observado de forma muy común en la República Checa.
Tipo 0803, 0581, 1851, 0411, 021N, 0914, 1701, <i>Haliscomenobacter hydrossis</i> , <i>Sphaerotilus</i> sp., <i>Acinetobacter</i> sp. y cianobacterias	Ocasionalmente observadas como dominantes en las espumas, pero con baja incidencia

Fuente: (Lechevalier & Lechevalier, 1974; Eikeboom, 1975; Goddard & Forster, 1987a, b; Sezgin, 1988; Blackbeard *et al.*, 1988; Blackall *et al.*, 1989; Richard, 1989; Wanner & Grau, 1989; Seviour *et al.*, 1990; Pujol *et al.*, 1991; Seviour *et al.*, 1994; Duchene, 1994b; Eikeboom *et al.*, 1997; Chun *et al.*, 1997; Wanner *et al.*, 1998; Madoni *et al.*, 2000; Lemmer *et al.*, 2005).

Estrategias generales de control. Una variedad de experiencias de métodos de control de espumas biológicas se han llevado a cabo en plantas piloto de laboratorio y a escala real. Los estudios de *foaming* en EDAR muestran que los métodos más comunes empleados son: uso de agua a presión, zonas de contacto, cloración en recirculación y retirada mecánica de espumas en superficie de tanques de aireación, canales y clarificadores secundarios (WEF, 1992; Wanner, 1994b).

Un método muy común no específico de control es a través de la aplicación de agentes químicos; como son los biocidas. La cloración en la corriente de recirculación o directamente en el licor mezcla es un método muy popular, con resultados de todo tipo. Esto es debido a que los filamentos formadores de *foaming* se acumulan de forma específica en la espuma y no se concentran en el licor mezcla, no siendo la cloración muy adecuada para controlar el organismo. Por ello, Wanner (1994b) sugirió la pulverización de la solución de cloro, o aspersión de hipoclorito de calcio en polvo directamente sobre la espuma. También se puede aplicar el desinfectante sobre las espumas o sólidos que permanecen en flotación y que son recirculados a cabecera de planta o decantador primario, con el fin

de evitar la reinfección (Tipping, 1995). Otro oxidante empleado de forma común es el ozono, el cual Goi *et al.* (1994) utilizó con una concentración de 2-6 mg/L en el tanque de aireación, observando una disminución de las espumas sin comprometer la calidad del efluente.

Coagulantes como el FeCl_3 se han añadido (4 g/Kg d), reduciendo en dos semanas el *foaming* causado por nocardioformes (Duchene, 1994). Sin embargo, el uso de agentes químicos para combatir el *foaming* no suele ser muy efectivo, así como tampoco lo son productos enzimáticos o microbianos comerciales (Duchene, 1994), antiespumantes (Ross & Ellis, 1992), aditivos bacterianos enzimáticos (Franz & Matsche, 1994). Por otro lado, también se ha estudiado la adición de partículas para modificar la hidrofobicidad superficial de la célula, obteniéndose tanto resultados positivos como negativos. En este sentido, tan solo la bentonita, talco y zeolita fueron eficaces en la disminución del potencial de espumación (Stratton *et al.*, 1998).

El uso de polímeros para el control de nocardioformes fue empleado en Los Angeles, California (Shao *et al.*, 1997). Una dosis de 0,5 mg/L de un polímero catiónico de poliacrilamida (Clarifoc LA-2691) dentro del canal de reparto del licor mezcla redujo el nivel de espumas y la abundancia de *Nocardia*. Existe una hipótesis de que los polímeros catiónicos son capaces de neutralizar (precipitando) los surfactantes aniónicos, por ello eliminan el efecto de la estabilización de la espuma causada por los mismos. Alternativamente, el polímero coagulado dispersó filamentos de *Nocardia* del flóculo, permitiendo de esta forma ser eliminados del sistema junto con el resto de los organismos del licor mezcla (Shao *et al.*, 1997). Otras aplicaciones para el control de espumas han resultado con éxito empleado PAX-14 para el control de "*M. parvicella*" (Roels *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2005), y FEX-120 en el caso de *Mycolata* (Kragelund *et al.*, 2010).

El proceso de la flotación selectiva puede ser aplicado al *foaming*. Pretorius & Laubscher (1987) demostraron que más del 95% de microorganismos formadores de espumas pueden ser eliminados dentro de las primeras horas de flotación selectiva. Dicho concepto fue introducido por Pagilla *et al.* (1996) en la clasificación de los selectores, los cuales eliminan selectivamente la espuma del licor mezcla del fango activo. Resultados en plantas piloto y a escala real mostraron que la clasificación de selectores redujo los niveles de *Nocardia* a menores niveles que aquellos reactores que no espumaban, mejorando el rendimiento de eliminación de estos organismos mediante la adición de un surfactante no iónico biodegradable.

Por último, el uso de selectores cinéticos o metabólicos para controlar el crecimiento filamentoso, originalmente propuesto en la década de 1970 (Chudoba & Pujol, 1994), ha aumentado en los últimos años. La selección cinética se basa en la mayor capacidad de absorción del sustrato de las bacterias formadoras de flóculo frente a las filamentosas bajo condiciones de concentración de sustrato alta. En cambio, la selección metabólica se basa en la

disminución de la capacidad de muchos filamentos de utilizar sustrato bajo condiciones anóxicas o anaerobias (Jenkins *et al.*, 2004).

Bulking

El crecimiento excesivo de bacterias filamentosas ha causado serios problemas operacionales durante décadas en las plantas de tratamiento de aguas residuales por fangos activos, entre ellos el conocido fenómeno del *bulking* filamentoso. En los últimos 30 años han sido numerosos los estudios que han intentado desarrollar estrategias para el control de estos organismos filamentosos, ya sea a través de métodos generales o a partir del conocimiento de su identidad, fisiología y ecología.

Las medidas de control de numerosos organismos filamentosos se han basado solo en identificación a nivel morfológico en muchas plantas a escala real y piloto. Anteriormente se ha indicado que solo unas pocas bacterias filamentosas pueden ser identificadas basándose en sus caracteres morfológicos, siendo los métodos basados en cultivo independiente herramientas más fiables en la identificación. Además, estudios detallados de su ecofisiología *in situ* han revelado incluso diferencias entre organismos, lo que sugiere que las medidas de control deberían ser consideradas de forma individual. Los datos disponibles sobre ecofisiología pueden ayudar a explicar el hecho que algunos organismos filamentosos sean difíciles de controlar, siendo muy importante el conocimiento del diseño de la planta, los parámetros operacionales y las características del agua residual para la selección de las medidas adecuadas de control.

Numerosos estudios han centrado sus objetivos en el conocimiento de la abundancia relativa de las bacterias filamentosas presentes en episodios de *bulking* en EDAR de diferentes países. La mayoría de las bacterias han sido descritas como morfotipos basándose en los manuales de Eikelboom y Jenkins. Solo recientemente se han desarrollado estudios basados en técnicas moleculares, como por ejemplo la técnica FISH, que permiten una identificación más fiable, así como el análisis metagenómico. Por lo tanto, y tal cual se ha indicado anteriormente, muchos de los primeros estudios tienen un interés más bien histórico y deberían tomarse como tal. Por ello, los intentos de relacionar los morfotipos filamentosos con su identidad real sigue siendo problemático, incluso en la actualidad muchos estudios se están llevando a cabo sin una identificación adecuada (Wanner *et al.*, 2010).

Estudios basados en técnicas convencionales. Además de aproximadamente 30 morfotipos filamentosos identificados en EDAR municipales (Eikelboom, 2000; Jenkins *et al.*, 2004), han sido identificados adicionalmente 40 morfotipos en EDARI, aunque muchos de estos últimos rara vez son observados (Eikelboom & Geurkink, 2002). La mayoría de ellos pueden originar *foaming* y *bulking*, pero es importante indicar que aproximadamente 10 de estos morfotipos son los causantes al menos del 90% de las incidencias de *bulking*, tanto en EDAR como EDARI

(Eikelboom, 2000; Eikelboom & Geurkink, 2002; Jenkins *et al.*, 2004). Algunos de ellos son incluso capaces de formar gruesas capas de espumas en las instalaciones sin ser necesariamente muy abundantes en el licor mezcla (Seviour *et al.*, 2004). Además, se ha determinado que la abundancia relativa y distribución de los morfotipos filamentosos dominantes puede variar incluso con la localización geográfica (Chua & Le, 1994).

Los principales organismos filamentosos identificados en EDAR municipales son: *Candidatus* 'M. parvicella', tipo 0041 y el grupo Mycolata. *Candidatus* 'M. parvicella' se considera uno de los filamentos dominantes en Europa, sur de África y Australia (Blackbeard *et al.*, 1986; Seviour *et al.*, 1994; Eikelboom *et al.*, 1998), pero ha sido clasificado con menor abundancia en plantas estudiadas en Tailandia y en US (Richard *et al.*, 1982; Mino, 1995). En general, este organismo ha sido clasificado más o menos con la misma abundancia en EDAR de Europa, sur de África y Argentina, aunque muestra diferencias en aquellas estudiadas en Australia y US. Por ejemplo, el tipo 1701 y el grupo Mycolata, ambos muy comunes en EDAR de USA, no han sido observados de una forma frecuente en EDAR de Europa. Sin embargo, estudios a pequeña escala indican que estos tipos pueden encontrarse ampliamente distribuidos (Eales *et al.*, 2005; Thomsen *et al.*, 2006b; Kragelund *et al.*, 2008a).

Estas discrepancias en sus abundancias relativas podrían ser explicadas en parte debido a las diferencias en la identidad de algunos morfotipos, pero la mayoría probablemente puedan ser debido a las diferencias en la presión selectiva impuesta en sus poblaciones en diferentes partes del mundo, consecuencia de las variaciones en los diseños de las EDAR y condiciones de operación, así como las características del afluente (Wanner *et al.*, 1987a, b; Jenkins *et al.*, 1993). En particular, los tipos filamentosos característicos de EDAR que solo eliminan el carbono orgánico, son notablemente diferentes de los correspondientes a aquellas instalaciones que nitrifican, incluso de los observados en las plantas con una eliminación completa del nitrógeno (nitrificación-desnitrificación). Por lo tanto, parece probable que su distribución y abundancia reflejan más sus requerimientos nutricionales que su localización geográfica, pudiendo cambiar su orden de clasificación en diferentes partes del mundo en función de los cambios en el diseño de las plantas y operación, como se observa en las plantas con eliminación de carbono frente a las de eliminación de nutrientes (Wanner *et al.*, 2010).

Estudios basados en la técnica FISH. Pocos estudios han sido desarrollados basándose en la identificación microscópica tradicional y análisis mediante la técnica FISH (Levantesi *et al.*, 2004; van der Waarde *et al.*, 1998, 2002; Mielczarek *et al.*, 2012; Andujar *et al.*, 2013). Por ejemplo, en los resultados encontrados por van der Waarde *et al.* (2002) se utilizaron 17 sondas moleculares aplicando la técnica FISH y se examinaron 81 muestras procedentes de 70 EDAR diferentes de Europa. Con la técnica FISH solo fue posible identificar las poblaciones dominantes de filamentos en el 45% de las muestras procesadas, indicando un porcentaje elevado de organismos no descritos. Filamentos pertenecientes al filo *Alfaproteobacteria* y filamentos similares a *H. hydrossis* fueron detectados en el 58%

de todas las muestras, mientras que *S. natans* y *Thiothrix* sp. se observaron en el 25% y 38% de las EDAR, respectivamente. Sin embargo, las abundancias de los diferentes organismos en las muestras industriales no fueron registradas, siendo por tanto desconocidos muchos de los filamentos potencialmente responsables del *bulking*.

En varios estudios se han desarrollado nuevas sondas de especies o grupos, aplicándose a un pequeño número de plantas con el fin de obtener la estimación de la abundancia de los distintos filamentos. Un ejemplo de este tipo de estudios fue el desarrollado con filamentos de la clase *Alfaproteobacteria*, apareciendo de forma significativa en plantas que tratan aguas residuales industriales (Levantesi *et al.*, 2004). Varias sondas dirigidas a la clase *Alfaproteobacteria*, y correspondientes a morfotipos similares a *Nostocoida limicola* y tipo 021N, fueron diseñadas y aplicadas a la biomasa presente en las muestras. Estos filamentos fueron detectados en el 65% del total de las muestras, relacionándolos como responsables del *bulking* en el 26% de estas. Además, dicho estudio mostró que los filamentos identificados en las plantas industriales de trabajos publicados anteriormente, como *Nostocoida limicola*, correspondieron a diferentes especies de filamentos de la clase *Alfaproteobacteria*.

Algunos microorganismos filamentosos, dentro de la clase *Betaproteobacteria*, hibridan con la sonda diseñada para *Aquaspirillum* (reclasificada como *Curvibacter* por Ding & Yokata, 2004), con una morfología muy similar al tipo 1701 (Thomsem *et al.*, 2006b). Este filamento fue muy abundante en varias EDAR con eliminación de nutrientes en Dinamarca, encontrándose principalmente dentro de los flocúlos y siendo por ello muy difícil su identificación sin la técnica FISH (Thomsen *et al.*, 2006b). Por otro lado, bacterias filamentosas pertenecientes al filo *Chloroflexi* han sido observadas en aproximadamente la mitad de las EDAR estudiadas por Kragelund *et al.* (2007a). Los filamentos pertenecientes a *Bacteroidetes* también han sido monitorizados en EDAR, siendo organismos comunes en EDAR y EDARI (Kragelund *et al.*, 2008a). En este estudio, fueron identificados en el 62% de las muestras examinadas, contribuyendo a episodios de *bulking* en el 24% de los casos. Además, estos filamentos se encuentran dentro del flocúlo sin crecimiento epifítico, siendo muy difícil su identificación a partir de rasgos morfológicos. Por otro lado, en el caso de *Candidatus* 'M. parvicella' y *Candidatus* 'M. calida' se estimó su ocurrencia en 21% y 5%, respectivamente, en las plantas industriales (Levantesi *et al.*, 2006). Las sondas FISH pertenecientes al grupo *Candidatus* división TM7, que engloban muchos filamentos del tipo 0041, constituyen en algunas plantas hasta un 15% de los morfotipos 0041/0675, siendo especialmente comunes en plantas de EBPR.

Los organismos filamentosos más abundantes en EDAR municipales e industriales. El *ranking* correspondiente a las especies de bacterias filamentosas o morfotipos encontrados en diferentes tipos de plantas de tratamiento se resume en la tabla 1.5. Esta clasificación se basa en todos los estudios realizados con la técnica FISH, resumidos en Wanner *et al.* (2010). Los filamentos más abundantes en plantas EBPR que tratan principalmente aguas residuales municipales son: *Candidatus* 'M. parvicella', algunos filamentos pertenecientes a *Candidatus* división TM7

(tipo 0041 y otros), algunas especies de *Chloroflexi* (tipo 1851 y otras), algunos filamentos relacionados con *Curvibacter* (tipo 1701 y otros), algunos *Bacteroidetes* (organismos similares a *H. hydrossis*), algunos Mycolata, tipo 0092 y tipo 0803. De todos ellos, solo *Candidatus* 'M. parvicella' causa serios problemas operacionales, mientras que el resto parece contribuir a episodios esporádicos de *bulking* y *foaming*. En plantas que tratan aguas residuales municipales con eliminación de carbono pero no de nitrógeno, se encuentran principalmente la clase *Alfaproteobacteria* (morfotipos de *Nostocoida limicola*), *Thiothrix* sp. (diferentes tipos de *Thiothrix* y tipo 021N), Mycolata (*Gordonia*) y posible tipo 1701 (identidad todavía no revelada por FISH). Todos ellos son capaces de generar serios problemas de *bulking* y *foaming*. En plantas que tratan aguas residuales industriales, los problemas de *bulking* están con frecuencia causados por: *Alfaproteobacteria* (morfotipos de *Nostocoida limicola*), *Thiothrix* sp. (diferentes tipos de *Thiothrix* y tipo 021N), Mycolata (morfotipos de *Gordonia* y *Skermania*) y posiblemente algunas especies de *Chloroflexi* (tipo 1851 y otros). Estos filamentos aparecen en plantas que tratan distintos tipos de aguas residuales industriales y con diferentes diseños (Eikelboom & Geurkink, 2002). Además, de forma ocasional, severos episodios de *bulking* se encuentran asociados a la presencia de filamentos no identificados, posiblemente favorecidos por las condiciones específicas de crecimiento de los procesos de producción de ciertas industrias (Pellegrin *et al.*, 1999).

Tabla 1.5. Ranking de los organismos filamentosos más abundantes que causan *bulking* en sistemas de fangos activos que tratan aguas residuales industriales y urbanas.

Organismos filamentosos	Plantas municipales	Plantas industriales
<i>Alfaproteobacteria</i> (<i>Nostocoida limicola</i>)	-	1
<i>Betaproteobacteria</i> (tipo 0803)	7	-
<i>Thiothrix eikelboomii</i> (tipo 021N)	-	2
<i>Thiothrix</i> tipos I y II	-	2
<i>Bacteroidetes</i> (tipo 0092)	6	-
<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	4	-
<i>Chloroflexi</i> (tipo 1851, tipo 0041/0675, tipo 1701)	2	4
<i>Candidatus</i> TM7 (tipo 0041/0675)	3	-
<i>Candidatus</i> 'Microthrix parvicella'	1	-
Mycolata (nocardioformes)	5	3

Fuente: Wanner *et al.* (2010).

Métodos de control del *bulking*. El *bulking* filamentoso es un problema que ocasiona una mala compactación y sedimentación del fango activo. Los efectos del *bulking* en los sistemas en los cuales el fango se clarifica por gravedad en un sedimentador son:

- Baja capacidad de retorno y purga de los SSLM.
- Dificultades en mantener la concentración de SSLM en los reactores biológicos, y por ello, pérdida del control sobre la EF.

- Mala deshidratación del fango.
- Sobrecarga hidráulica del fango en las instalaciones.

Las bacterias filamentosas pueden interferir en la sedimentación y compactación del fango de dos formas:

1. Algunos filamentos, principalmente de escasa longitud, se desarrollan preferentemente dentro del flóculo, ocasionando una estructura flocular disgregada. Estos flóculos disgregados proporcionan abundantes espacios abiertos para la retención del agua (figura 1.14a).
2. Otras bacterias tienen la capacidad de formar largos tricomas, los cuales unen los flóculos dificultando la bioagregación de los mismos (puentes interfoculares), y por tanto, dificultando la compactación del fango activo (figura 1.14b).

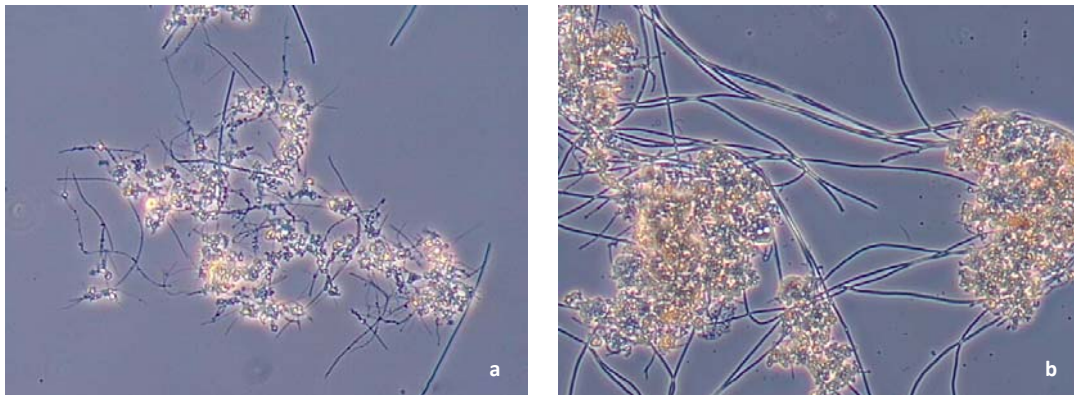


Figura 1.14. Estructura flocular relacionada con episodios de *bulking* filamentoso. (a) Estructura flocular disgregada. (b) Puentes interfoculares. Autor: Andrés Zornoza.

Sin embargo, las propiedades finales de sedimentación del fango activo no solo dependen de la cantidad y tipo de poblaciones de bacterias filamentosas, sino del equilibrio entre la macroestructura y microestructura. Empíricamente se ha observado que flóculos con abundantes microcolonias de PAO y bacterias nitrificantes contribuyen a mejorar la sedimentabilidad del fango (Larsen *et al.*, 2006, 2008). Por otro lado, la presencia de núcleos bien desarrollados favorece la velocidad de sedimentación, aun en presencia de abundantes puentes interfoculares.

Los conocimientos actuales sobre la dinámica poblacional de bacterias filamentosas y microorganismos formadores de flóculo, aunque todavía incompletos, permiten a los responsables de EDAR aplicar medidas de control del *bulking* basadas en principios científicos. Si combinamos los conocimientos microbiológicos actuales que causan *bulking* con los métodos de control, se obtienen los denominados métodos de control “biotecnológicos” (Wanner *et al.*, 2010). No obstante, hay que señalar que los microorganismos filamentosos no han sido identificados en muchos de los casos

utilizando la técnica FISH, fracasando por ello muchos de los métodos utilizados por responsables de EDAR basados en el sistema de identificación convencional. Por último, existe otro enfoque para combatir los problemas de *bulking*, basados en medidas de control no específicas.

A) Métodos “biotecnológicos” para el control del *bulking*

Factores externos que afectan a la composición del fango activo

1. Composición del agua residual. El agua residual es una mezcla de sustratos, nutrientes y micronutrientes, los cuales condicionan la comunidad de microorganismos del fango activo. Los sustratos se pueden presentar de distintas formas:

a) *Sustratos fácilmente biodegradables.* Compuestos orgánicos de bajo peso molecular, por ejemplo, moléculas simples que pueden ser utilizadas directamente por las células (p.ej. monosacáridos, alcoholes, ácidos grasos volátiles y aminoácidos). Estos representan el 10-20% de la DQO de la mayoría de las ARU, lo cual se piensa que favorece el crecimiento de bacterias filamentosas como el tipo 021N, *Sphaerotilus natans*, *Nostocoida limicola* y quizás *H. hydroxsis*.

Los compuestos reducidos del azufre pueden ser fácilmente metabolizados como fuente de energía, favoreciendo el crecimiento de filamentos como el tipo 021N/*Thiothrix* o *Beggiatoa*. Sin embargo, la fracción fácilmente asimilable de los compuestos reducidos del azufre en ARU no es suficientemente alta como para originar problemas serios de *bulking*. Largos tramos de colectores de ARU con escasa pendiente, una mala mezcla en el reactor o vertidos, pueden producir concentraciones significativas de estos compuestos.

b) *Sustratos particulados lentamente biodegradables.* La mayoría de compuestos orgánicos en ARU están presentes como sustratos particulados de alto peso molecular (sólidos suspendidos y coloidales). Para poder ser utilizados como fuente de energía por las bacterias necesitan ser degradados previamente a través de enzimas extracelulares (mecanismos de hidrólisis), siendo los productos resultantes fácilmente biodegradables. El impacto de la hidrólisis de sustratos particulados en el *bulking* filamentoso depende de muchos factores, que incluyen:

- La relación entre los niveles de sustratos particulados y la biomasa del flóculo.
- La relación anterior condiciona la tasa de consumo de los productos de hidrólisis dentro de los flóculos, y los ratios elevados liberan más productos de hidrólisis por difusión fuera de los flóculos.
- La tasa de difusión de los productos de hidrólisis se encuentra determinada por el gradiente de concentración entre el interior del flóculo y el lugar donde se concentran los filamentos.

Las principales estrategias recomendadas para el control de bacterias filamentosas causadas por una elevada concentración de sustratos particulados son, según Wanner *et al.* (2010):

- Mantener una baja relación entre sustratos particulados y niveles de biomasa en los flóculos del fango activo, operando con una elevada EF.
- Para reducir el crecimiento excesivo de filamentos debido a los productos de hidrólisis liberados en el líquido abultado, se recomienda compartimentar incluso la etapa de nitrificación.

Algunos sustratos particulados parecen favorecer de forma selectiva el crecimiento de algunas bacterias filamentosas, como por ejemplo los aceites y grasas en el caso del grupo Mycolata y ácidos grasos de cadena larga en el caso de *Candidatus* 'M. parvicella'.

2. Temperatura, pH y compuestos tóxicos. Las propiedades físicas y composición química del afluente sin duda se encuentran entre los parámetros más importantes que determinan la comunidad biológica del fango activo.

Factores intrínsecos

1. Tiempo de retención de la biomasa. El tiempo de retención celular de la biomasa condiciona la distribución individual de las poblaciones en la comunidad del fango activo, de acuerdo con sus tasas de crecimiento y *decay*. Desafortunadamente, los valores de EF “seguros” en los cuales las bacterias filamentosas son retiradas del sistema en la medida necesaria para el control del *bulking* son muy bajos.

2. Concentración de sustrato en el reactor. Comunidades en fangos activos cultivadas en reactores con gradientes de concentración de sustrato adquieren ciertas características, las cuales son con frecuencia descritas como efecto “selector”. Estas son:

- Altas tasas de consumo de sustrato.
- Alta tasa de utilización de aceptores externos de electrones.
- Facilita el crecimiento de las bacterias formadoras de flóculo.

La mayoría de métodos biotecnológicos actuales para el control del *bulking* utilizan la existencia de gradientes de concentración de sustrato en los reactores, independientemente de otras condiciones que dominan en ellos (reactores óxicos, anóxicos y anaerobios). El gradiente de sustrato se logra con una adecuada compartimentación de la totalidad del volumen del reactor, o en su cabecera (selector). El efecto de la selección metabólica se genera por cambios de compartimentos aireados y no aireados. La selección basada en el almacenamiento de sustratos

necesita de un gradiente de concentración para condicionar un crecimiento desequilibrado, y del tiempo para el metabolismo de los sustratos almacenados (regeneración de la capacidad de almacenamiento).

3. Oxígeno disuelto, sustrato orgánico, nutrientes, pH y temperatura en reactores biológicos.

a) *Oxígeno disuelto y sustrato orgánico.* Algunas bacterias filamentosas (p.ej. *S. natans*/tipo 1701 y *H. hydrossis*) poseen un alta afinidad por el OD debido a los valores bajos de sus constantes de saturación. Los valores límite de OD en los cuales se pueden presentar fenómenos de *bulking* no se encuentran determinados, ya que dichos valores dependen a su vez de la carga orgánica aplicada al fango activo. El aumento de la carga del fango aumenta a su vez la tasa de sustrato asimilado, lo cual aumenta el oxígeno consumido en los flóculos. Así pues, elevadas concentraciones de oxígeno en el fango abultado no evita el crecimiento de los denominados “filamentos característicos de bajo OD”. Sin embargo, concentraciones de OD por debajo de 0,5 mg/L pueden potenciar el crecimiento de dichos filamentos, especialmente cuando los sustratos solubles están presentes en el licor mezcla (Jenkins *et al.*, 1993). Algunos organismos filamentosos también pueden tener una elevada afinidad por sustratos orgánicos, probablemente más elevado que la mayoría de bacterias formadoras de flóculo (Jenkins, 1992), como por ejemplo *Thiothrix* sp. y *Meganema perideroedes* (Nielsen *et al.*, 2003b; Kragelund *et al.*, 2005).

b) *Nutrientes.* De la misma forma que el OD, algunas bacterias filamentosas poseen mayor afinidad que otras por ciertos nutrientes (p.ej. nitrógeno, fósforo y micronutrientes), como resultado de la adopción de estrategia (K_s) bajo condiciones de crecimiento equilibrado. Por lo tanto, se hace necesario en muchas ocasiones la adición de nutrientes para el control del *bulking*. De la misma forma que el *bulking* originado por OD, la magnitud de los problemas causados por “filamentos por baja concentración de nutrientes” depende del flujo de sustrato orgánico dentro de los flóculos. Una falta de nitrógeno también puede ser enmascarada por sus formas químicas, ejemplificado en procesos de tratamiento biológico de aguas residuales de la industria de productos lácteos. Dichas aguas residuales presentan una adecuada relación entre la DBO₅ y nitrógeno para el tratamiento biológico. Sin embargo, los resultados analíticos indican que se trata de nitrógeno orgánico, el cual es lentamente biodegradable, y por ello, no aprovechable para el crecimiento de organismos formadores de floculo. Bajo esta situación son numerosos los episodios de *bulking* con presencia excesiva de filamentos del tipo 021N. Experiencias similares se pueden encontrar en tratamientos biológicos de empresas papeleras, cuyos afluentes son deficitarios en nitrógeno y fósforo.

Como pautas generales para la dosificación de nutrientes se pueden utilizar, desde el punto de vista experimental en plantas a escala real, las siguientes concentraciones en el efluente final: 1 mg/L al menos de nitrógeno amoniacal y 0,2 mg/L de fósforo del ortofosfato (Wanner, 1994a).

c) *pH*. Actualmente no existen referencias sobre episodios de *bulking* filamentoso relacionados directamente con valores extremos de pH. Algunos hongos prefieren valores bajos de pH, no obstante, a pesar de que el pH puede disminuir en algunos reactores debido al proceso de nitrificación, es muy improbable en estos casos el crecimiento excesivo de hongos.

d) *Temperatura*. La temperatura afecta a la velocidad de los procesos bioquímicos, así como la solubilidad del oxígeno en el licor mezcla. Existen bacterias filamentosas capaces de adaptarse a elevadas temperaturas y bajas concentraciones de OD, siendo recomendable el cálculo de la capacidad de oxigenación de los sistemas de aireación para las temperaturas más altas esperadas del licor mezcla durante el año, con el fin de garantizar la concentración de OD recomendada que puede alcanzarse en climas cálidos.

Se ha observado cambios bruscos estacionales en la dominancia de ciertos morfotipos filamentosos. Es común la dominancia de *Candidatus* 'M. parvicella' en invierno (Levantesi *et al.*, 2006), mientras que las bacterias del grupo Mycolata parecen estar más influenciadas por climas templados (Soddell, 1999).

Medidas de control del *bulking* filamentoso basadas en características ecofisiológicas. Varios estudios basados en la ecofisiología de las bacterias filamentosas, utilizando la técnica FISH-MAR así como otras técnicas moleculares, han aportado valiosa información sobre su fisiología *in situ*, explicando su presencia en determinadas EDAR, y por lo tanto, estableciendo posibles estrategias para su control (resumidos en Nielsen *et al.*, 2009a).

Algunas bacterias filamentosas se encuentran bien adaptadas al crecimiento bajo un amplio rango de sustratos solubles, debido a que tienen una tasa elevada de absorción de sustrato o una elevada capacidad de almacenamiento, una relativamente alta tasa de crecimiento y una baja actividad exoenzimática para la degradación de macromoléculas. Esta situación puede darse principalmente en sistemas con altos niveles de sustratos solubles, por ejemplo en plantas industriales, donde predominan algunas de las alfaproteobacterias (p. ej. el morfotipo *Nostocoida limicola*) y gammaproteobacterias (*Thiothrix* y tipo 021N).

Otras bacterias filamentosas parecen estar bien adaptadas a crecer en EDAR con baja CM, lo cual requiere la degradación de sustratos particulados. Estas bacterias se caracterizan por ser capaces de asimilar solo unos pocos sustratos con bajas tasas de absorción, baja o nula capacidad de almacenamiento y producción de mucha actividad exoenzimática. Por lo tanto, muchas de estas bacterias se encuentran situadas preferentemente en el interior de los flóculos, donde con frecuencia forman parte de la macroestructura del mismo. Este grupo incluye bacterias filamentosas con crecimiento epifítico (filo *Chloroflexi*, especies relacionadas con *Curvibacter* y *Candidatus* división TM7), *H. hydrossis* y *Candidatus* 'M. parvicella'.

Un tercer grupo consiste en las Mycolata formadoras de espumas (principalmente *Gordonia* sp. y *Skermania* sp.). Su crecimiento es relativamente lento bajo sustratos solubles, aunque parecen estar principalmente asociadas con plantas que tratan agua residual con alto contenido en lípidos, aunque no siempre. *Gordonia* y *Skermania* pueden ser controladas por adición de productos químicos (Kragelund *et al.*, 2007c).

Las bacterias filamentosas utilizan principalmente el oxígeno como aceptor terminal de electrones, aunque muchas de ellas pueden usar también nitrato y nitrito, reduciéndose de una forma importante su tasa de crecimiento. En cambio, pueden tomar el sustrato en presencia de nitrato y nitrito, probablemente para almacenarlo y poder ser utilizado posteriormente en situaciones muy desfavorables “poco alimento”. Todavía no se conoce la forma en que algunas bacterias filamentosas son capaces de llevar a cabo una desnitrificación completa. Estas se encuentran dentro de la clase *Alfaproteobacteria* (Kragelund *et al.*, 2006). Por otro lado, *Candidatus* ‘M. parvecella’ asimila de forma sustancial cantidades de ácidos grasos de cadena larga en condiciones anaeróbicas, pero el crecimiento es solo aparentemente en presencia de oxígeno o nitrato (Hesselsoe *et al.*, 2005; Rosseti *et al.*, 2005).

El avance en el estudio de las características ecofisiológicas ayuda a explicar por qué las distintas bacterias filamentosas pueden crecer en los diferentes tipos de tratamiento biológico, y lo más importante, como pueden ser controladas. A modo de ejemplo, aquellas que pueden utilizar un amplio rango de sustratos solubles pueden ser controladas en las EDAR creando un gradiente de sustrato (selectores), incluyendo también etapas anóxicas y anaerobias. Para el control de *Thiothrix* y tipo 021N deben evitarse, y en su caso, ser eliminados compuestos reducidos del azufre. La mayoría de filamentos que son capaces de degradar sustratos particulados se encuentran especialmente presentes en EDAR que operan con elevadas EF y con eliminación de nutrientes. Estos organismos ocasionalmente causan problemas severos de *bulking* (excepto *Candidatus* ‘M. parvicella’), no siendo especialmente controlables a través de selectores, aunque elevadas EF y compartimentación de reactores aerobios podrían ser de gran ayuda.

B) Métodos no específicos de control del *bulking*

Existen otros métodos muy populares y extendidos para el control del *bulking* filamentoso, los cuales no están dirigidos a controlar el crecimiento de filamentos, sino a eliminar directamente su presencia.

Medidas encaminadas a la eliminación de la presencia de filamentos. Estos métodos son aplicables a la eliminación de problemas originados por filamentos que forman puentes interfloculares. En esta situación, los largos tricomas se encuentran más expuestos a las dosis de agentes químicos que las bacterias formadoras de flóculo. De esta forma, y dado que la mayoría de agentes químicos no son selectivos, se evita comprometer la eliminación de la materia carbonosa y en la medida de lo posible, la eliminación de nutrientes. Para el control de bacterias filamentosas

en plantas depuradoras a escala real se ha utilizado con mucha frecuencia la cloración (Jenkins *et al.*, 2004; Montoya *et al.*, 2009), pero no en todos los países. Sin embargo, la cloración del fango activo es un método preventivo y no debería ser utilizado como una solución permanente.

Incremento de la velocidad de sedimentación. Tal cual se ha señalado anteriormente, el crecimiento excesivo de bacterias filamentosas reduce la velocidad de sedimentación del fango activo, debido a la formación de puentes interfloculares y estructuras floculares abiertas y disgregadas. Una de las formas para compensar esta lenta sedimentación es incrementando el peso específico de los flóculos con ayuda de las siguientes estrategias:

- Adición de suspensiones minerales en el licor mezcla (suspensión del suelo, partículas procedentes del efluente primario) o dejando fuera de servicio la decantación previa al reactor.
- Adición de fango digerido al licor mezcla (esta acción debe realizarse con mucho cuidado debido a que puede originar un déficit de oxígeno en los reactores biológicos).
- Formación de flóculos más pesados por precipitación de compuestos minerales, siendo el método más empleado la adición de sales de hierro en el licor mezcla (Wanner *et al.*, 2000).

Compensación de la velocidad de sedimentación lenta. Una posible solución es la construcción de nuevos clarificadores secundarios, los cuales sean más compatibles cuando se originen deficiencias en la sedimentación del fango activo. Los clarificadores secundarios más resistentes ante episodios de *bulking* presentan las siguientes características (Ekama *et al.*, 1997; ATV Design Standard A1331, 2000; Wanner, 2006):

- Una zona especialmente diseñada para una eficiente floculación del fango activo.
- Aumentar el número de clarificadores con el fin de aumentar el TRH del licor mezcla.
- Reducción de movimientos hidráulicos o mecánicos bruscos en el manto de fango sedimentado que puedan elevar el fango a la superficie.

1.9 Protistas

En el Reino Protista se incluyen todos aquellos organismos eucariontes microscópicos que no pueden clasificarse dentro de alguno de los otros tres reinos eucariotas: Fungi (hongos), Animalia (animales) o Plantae (plantas). En el árbol filogenético de los organismos eucariontes, los protistas son un grupo polifilético, es decir, incluyen varios grupos monofiléticos separados. Se les designa con nombres que han perdido valor filogenético en biología, pero cuyo uso sería imposible desterrar, como hongos mucosos, algas o protozoos.

Aunque gran parte de los protistas son unicelulares, también hay protistas coloniales o que forman sincitios o plasmodios. La mayoría de los protistas pueden moverse gracias a su capacidad para emitir pseudópodos, o a la presencia de cilios o flagelos. Hay que tener en cuenta que, a lo largo de la historia, la clasificación del Reino Protista ha ido cambiando según los criterios empleados por los distintos autores, aumentando el conocimiento sobre su estructura, fisiología y ecología.

Los protistas presentan diversidad metabólica y nutricional. Hay protistas fotoautótrofos, quimioorganoheterótrofos, algunos son osmotrofos y utilizan la materia orgánica disuelta o particulada, mientras que otros se alimentan de otros organismos por distintas estrategias de fagocitosis. Sus ciclos biológicos también son variables, en algunos casos muy complejos, presentando en la mayoría de los casos tanto reproducción asexual como sexual (Hausmann *et al.*, 2003).

Los protistas se alimentan por ingestión de materia orgánica en disolución mediante mecanismos de pinocitosis, donde las sustancias en disolución entran con el agua formando vacuolas de pinocitosis. Sin embargo, la mayoría de los protistas son capaces de llevar a cabo procesos de fagocitosis, englobando partículas que son introducidas por un proceso de invaginación de la membrana citoplasmática, y llevada al interior del citoplasma para formar una vacuola fagocítica. En ocasiones la formación de las vacuolas de fagocitosis tiene lugar en una zona de la célula denominada citostoma.

Muchos de estos organismos capturan activamente el alimento mediante estrategias que implican en muchos casos sus mecanismos de movimiento. Si bien en la actualidad no es un criterio preferente para su clasificación, el tipo de movimiento se empleó para clasificar estos organismos en épocas pasadas. Actualmente se utilizan los términos como amebas, flagelados y ciliados para designar aquellos organismos que presentan pseudópodos, flagelos o cilios, respectivamente. En fangos activos estos términos se utilizan a menudo.

La presencia de protistas en procesos de tratamiento biológico del agua residual fue observada en las primeras etapas de introducción del proceso (Johnson, 1914). En sistemas modernos, que operan con baja carga másica y elevado tiempo de retención del fango, la presencia de protistas o metazoos, es muy común. Estos organismos eucariotas son capaces de alimentarse de partículas, como por ejemplo bacterias libres, siendo la clarificación del efluente su principal papel en el tratamiento del agua residual.

Los protistas son organismos que se encuentran de forma común en el fango activo de las EDAR, sus densidades son aproximadamente del orden de $3-20 \times 10^6$ ind/L (Madoni, 2011). Numerosos autores han divulgado listas de protistas encontrados en fangos activos (Agersborg & Hatfield, 1929; Ardern & Lockett, 1936; Clay, 1964; Brown, 1965; Curds & Cockburn, 1970a; Morishita, 1970). La primera lista completa de 228 especies de protistas fue

propuesta por Curds (1975), de los cuales 160 pertenecen al filo Ciliophora, aunque solo un número limitado han sido observados de forma habitual (Madoni, 2011). Debido a que el tratamiento de las aguas residuales es un proceso biotecnológico con una importancia creciente en el mundo, la presencia y acción de las comunidades microbianas ha recibido una especial atención en los últimos años. Como consecuencia, listas revisadas de protistas han sido publicadas a posteriori (Madoni & Ghetti, 1981; Augustin & Foissner, 1992; Madoni *et al.*, 1993; Foissner & Berger, 1996; Martín-Cereceda *et al.*, 1996; Amann *et al.*, 1998; Ettl, 2001; Madoni, 2002; Chen *et al.*, 2004; Curds *et al.* 2008, Serrano *et al.*, 2008a). Algunos estudios indican que la comunidad de protistas varía en la mayoría de EDAR en función de las condiciones operacionales, así como de los factores ambientales; como la temperatura, pH, amonio, salinidad o concentración de metales pesados (Curds, 1975; Poole, 1984; Hoffman & Atlas, 1987; Al-Shahwani & Horan, 1991; Esteban *et al.*, 1991; Salvadó & Gracia, 1993; Madoni *et al.*, 1993, 1996; Salvadó, 1994; Madoni, 1994b; Salvadó *et al.*, 1995, 2001; Martín-Cereceda *et al.*, 1996; Abrahan *et al.*, 1997; Lishman *et al.*, 2000; Nicolau *et al.*, 2005, 2007; Puigagut *et al.*, 2005).

Los protistas son, junto con las bacterias, el grupo de microorganismos más importantes dentro de la microbiota de los fangos activos. Constituyen aproximadamente el 5% del peso seco de la materia en suspensión del licor mezcla (Curds, 1968; Bitton, 1980; Fernández-Galiano *et al.*, 1996; Serrano *et al.*, 2008), aunque algunos autores estiman que pueden alcanzar valores de 250 mg/L (peso seco), constituyendo aproximadamente el 9% de los sólidos volátiles (Madoni, 1994a).

1.9.1 El papel de los protistas en el tratamiento del agua residual

Originalmente se pensaba que los protistas eran organismos perjudiciales para el proceso de fangos activos (Fairbrother & Renshaw, 1922). Sin embargo, algunos autores fueron capaces de evaluar el papel de estos organismos y cuantificar la magnitud de su efecto sobre la calidad del efluente, determinando que la ausencia de protozoos en el licor mezcla originaba valores elevados de la DBO₅ en el efluente tratado (Curds *et al.*, 1968). Además, el efecto positivo de los protistas en la mineralización del carbono a través de los procesos de bacterivoría se encuentra bien documentado (Ratsak *et al.*, 1996) y demostrado por algunos autores utilizando bacterias marcadas con fluorescencia (Eberl *et al.*, 1997). La excreción de nutrientes minerales por parte de los protistas genera como resultado un uso acelerado del carbono por las bacterias (Coleman *et al.*, 1978; Bloem *et al.*, 1988; Tezuka, 1990). Además, estos excretan compuestos estimulantes de crecimiento que pueden acelerar la actividad bacteriana (Nisbet, 1984; Horan, 1990). Sin embargo, estos efectos indirectos sobre el crecimiento bacteriano no son responsables del incremento de la mineralización del carbono bajo condiciones de limitación del mismo (Curds 1982). Por ello, en sistemas de aguas residuales con una concentración de sustrato baja, dichos procesos adquieren poca importancia.

Los protistas también tienen una influencia indirecta en la clarificación del efluente a través de sus efectos sobre los procesos de biofloculación:

- Estimulando la actividad bacteriana (Curds, 1977) y contribuyendo directamente con la secreción de SPE.
- Contribuyendo en la estructura y distribución de tamaño del flóculo a través de la secreción de sustancias y su actividad biológica (Curds, 1963; Ratsak, 1996; Arregui *et al.*, 2007, 2008; Weber *et al.*, 2007), mejorando de esta forma su sedimentabilidad.

A pesar de la relación de los protistas con la eliminación de la materia orgánica en los procesos de tratamiento (Curds & Cockburn, 1970a, b; Curds, 1973), una de sus funciones más importantes es la participación en las cadenas tróficas, principalmente en la depredación sobre las poblaciones de bacterias libres (procesos de bacterivoría), jugando por ello un papel directo en el proceso de eliminación de contaminantes y microorganismos patógenos del licor mezcla (Curds *et al.*, 1968; Curds, 1973; Madoni, 1994b; Holubar *et al.*, 2000). Aunque algunos protistas (ciliados reptantes y otros organismos que ingieren bacterias floculantes) estimulen el crecimiento bacteriano en el flóculo, la mayoría de ellos (fundamentalmente los ciliados sésiles) solo lo hacen de partículas y bacterias libres. Por ello, se consideran principalmente consumidores primarios en el tratamiento del agua residual, mejorando la calidad del efluente (Curds & Cockburn, 1970b; Curds & Hawkes, 1983; Esteban *et al.*, 1991b; Al Shahwani & Horan, 1991; Madoni *et al.*, 1993; Salvado *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2004) y contribuyendo de forma indirecta a la reducción de la producción de fangos (Lee & Welander, 1986; Lee & Oleszkiewicz, 2003), que en algunos casos puede ser mayor del 25% (Ghyoot & Verstraete, 1999). Esta actividad predatoria podría estar también relacionada con la distribución y composición bacteriana, tal cual se ha indicado en diferentes ambientes acuáticos (Güde, 1979; Simek *et al.*, 1997; Jürgens *et al.*, 1999; Hahn & Höfle, 2001). Por ejemplo, Fenchel (1980, 1986) propone que cada una de las especies de ciliados selecciona las partículas alimenticias en base a su tamaño, lo cual se ve reflejado en los rasgos morfológicos de la zona oral de las diferentes especies. Gurijala & Alexander (1990) también demostraron la selectividad en la alimentación y demostraron que uno de los rasgos protectores de las bacterias frente a la actividad predatoria de los protistas era su hidrofobicidad. Cech *et al.* (1994) indicaron que las bacterias GAO sobreviven en las plantas de fangos activos gracias a su facilidad para la formación de capsulas. Luxmy *et al.* (2000) encontraron que la distribución de tamaños de bacterias y flóculos se encuentra muy influenciada por la actividad predatoria de los ciliados, apareciendo bajos porcentajes de bacterias (1 μm) y floculos de pequeño tamaño (<10 μm) en presencia de un elevado número de ciliados bacterívoros. Por otro lado, resultados experimentales de Güde (1979) sugieren que las bacterias filamentosas, debido a su morfología, son consumidas en menor proporción que las unicelulares. Sin embargo, Inamori *et al.* (1991) y Terashi & Hamada (1991) han descrito algunos ciliados que poseen cierta facilidad

para alimentarse de algunas bacterias filamentosas, indicando su utilidad para el control de dichos filamentos en las EDAR.

En presencia de ciliados se ha observado también una reducción de colonias viables de *Escherichia coli* (Curds & Fey, 1969; Mallory *et al.*, 1983). Por otro lado, varios estudios han asociado la reducción de bacterias coliformes a la presencia de protistas, encontrándose que la depredación de estos puede ejercer una presión sobre las poblaciones bacterianas (Enzinger & Cooper, 1976; McCambridge & McMeekin, 1980; Lee *et al.*, 2004). Bitton (2002) también señala la importancia de la depredación de protistas sobre las poblaciones de bacterias patógenas y fecales, contribuyendo con ello a una eficiencia del rendimiento en su eliminación del 95%. Otros estudios se han centrado de forma específica en la depredación de bacterias relacionadas con el ciclo del nitrógeno (Verhaugen & Laanbroek, 1991; Petropoulos & Gilbride, 2005; Pogue & Gilbride, 2007). Verhaugen & Laanbroek (1992) presentaron evidencias de predación selectiva del flagelado *Adriomonas peritocrescens* sobre la población de bacterias nitrificantes. En estos estudios se ha observado que la presencia de protistas aumenta la tasa de nitrificación, probablemente debido a la capacidad de influencia de los protistas sobre el crecimiento bacteriano. Además, son capaces de liberar productos orgánicos e inorgánicos en su entorno. Estos productos son principalmente nutrientes reciclados, tales como nitrógeno, fósforo y carbono orgánico, pero también pueden contener compuestos estimulantes que contribuyen a consumir las reservas (inclusiones) de carbono orgánico y afectar el estado fisiológico y crecimiento de las bacterias.

La capacidad de utilización de sustratos solubles por parte de los protistas es conocida, sin embargo, hasta el momento no existen estudios cuantitativos realizados sobre utilización de dichos sustratos en presencia de abundantes bacterias libres como fuente de alimento. Es poco probable que los protistas puedan competir con éxito con las bacterias por tales sustratos, no siendo por ello relevante su función en la mineralización de la materia orgánica soluble (Warren *et al.*, 2010). Por último, los efectos de los compuestos orgánicos particulados frente a los solubles sobre la microbiota y la eficiencia en el tratamiento ha sido investigado por Puigagut *et al.* (2007), encontrando mayores niveles de ciliados en sistemas enriquecidos con glucosa respecto a aquellos con almidón, siendo contrario en el caso de los metazoos.

1.9.2 Identificación y clasificación de protistas en fangos activos

La identificación de protistas en fangos activos se basa en la observación microscópica de las muestras en fresco y, en ocasiones, en la utilización de tinciones argénticas o con fluorocromos específicos (Fernández-Galiano, 1976, 1994; Arregui *et al.*, 2002, 2003). Actualmente se han introducido algunas consideraciones importantes en la clasificación sistemática de Levine *et al.* (1980). Las claves de identificación más actualizadas están basadas en la clasificación de la *Society of Protozoologists* (Lee, J.J., Leedale, G.F. y Bradbury, P. Eds. 2000. *An Illustrated Guide to the*

Protozoa. 2nd ed. Vols. I and II. *Society of Protozoologists*. Lawrence, Kansas. USA). Esta clasificación recoge las últimas propuestas respecto a la sistemática de protistas publicada por diferentes grupos de especialistas en la materia (Levine *et al.* 1980; Puytorac *et al.* 1987; Lee *et al.*, 2000; Cavalier-Smith, 2002, 1998; Haussman *et al.*, 2003; Adl *et al.*, 2005). La clasificación no se basa únicamente en características morfológicas o morfogenéticas (caracteres tradicionales de clasificación en los protistas), sino también en características ultraestructurales y moleculares, así como en estudios filogenéticos (Margulis, 1990; Cavalier-Smith, 2002, 1998).

El tipo de movimiento y la presencia/ausencia de apéndices móviles es una característica fácilmente observable en las muestras en fresco. Así, una primera aproximación a la identificación sería la inclusión en alguno de los siguientes grupos:

- **Presencia de apéndices móviles (flagelos o cilios)**
 - **FLAGELADOS:** uno o varios flagelos que emergen en posición apical o subapical; formas verdes (metabolismo fotosintético) o incoloras (osmótrofas o fagótrofas).
 - **CILIADOS:** numerosos cilios somáticos organizados en cinetias; ciliación oral asociada al citostoma (superficial o en un embudo bucal); dualismo nuclear.

- **Movimiento mediante pseudópodos**
 - **SARCODINOS:** emisión de pseudópodos no permanentes (amebas desnudas y testáceas) o presencia de pseudópodos permanentes (axopodos de los heliozoos).

Flagelados

El término colectivo tradicional de “flagelados” hace referencia a organismos con uno o más flagelos, que actúan como orgánulos para la locomoción y la alimentación. Los flagelos pueden:

- Originar movimientos ondulantes que, por un lado, propulsan al organismo en su desplazamiento en un medio acuoso y además provocan la creación de corrientes que atraen o atrapan el alimento en la zona de ingestión.
- Contribuir a la adhesión sobre superficies sólidas.

Una de las características básicas en este grupo es el número y disposición de los flagelos. A continuación se describen algunos de los caracteres morfológicos de los grupos más comunes en EDAR.

- Chrysomonadida (Crisomonádidos)

Individuos solitarios o coloniales con células normalmente de pequeño tamaño con dos flagelos anteriores desiguales y escamas silíceas superficiales. Algunos de ellos presentan cloroplastos de color pardo, otros son incoloros. Dentro de este grupo se encuentran los géneros *Synura*, *Anthophysis*, *Oikomonas* y *Spumella*.

- Cryptomonadida (Cryptomonadidos)

Células aplanadas con forma arrañada u ovoide (a menudo truncadas anteriormente). Dos flagelos subapicales ligeramente desiguales. Cripta con tricocistos. Especies con cloroplastos de color verde o incoloras. Dentro de este grupo se encuentran los géneros *Cryptomonas*, *Chilomonas* y *Goniomonas*.

- Euglenida (Euglénidos)

Células con 1-3 flagelos que emergen anteriormente de un reservorio. Alguno de los flagelos puede dirigirse hacia la parte posterior de la célula (en ocasiones presentan también un flagelo no emergente no visible con microscopia óptica) (figura 1.15a y b). Las formas verdes pueden presentar un número variable de cloroplastos y un estigma rojizo en la zona del reservorio. También hay especies incoloras. Dentro de este grupo se encuentran los géneros *Euglena*, *Anisonema* y *Peranema*.

- Volvocida (Volvócidos)

Especies individuales o coloniales y nadadoras en el licor mezcla. En general, dos o cuatro flagelos anteriores iguales y divergentes. En las especies fotosintéticas, un único cloroplasto con forma de copa de color verde con el estigma rojizo asociado al plasto. Gránulos de reserva de almidón. Están en la base evolutiva de los vegetales. Dentro de este grupo se encuentran los géneros *Chlamydomonas*, *Polytoma* y *Eudorina*.

- Choanoflagellida (Coanoflagelados)

Células incoloras con un collar anterior muy transparente al microscopio óptico del cual emergen de 1-3 flagelos (figura 1.15c). Formas nadadoras libres o sésiles, a veces coloniales. Relacionados filogenéticamente con los primeros animales. Dentro de este grupo se encuentran los géneros *Codonosiga* y *Monosiga*.

- Kinetoplastea (Kinetoplástidos)

Células incoloras con dos flagelos, uno anterior y un segundo flagelo más largo recurrente (figura 1.15d). Formas nadadoras libres, aunque pueden adherirse al sustrato por el extremo anterior del flagelo más largo. Dentro de este grupo se encuentra el género *Bodo*.

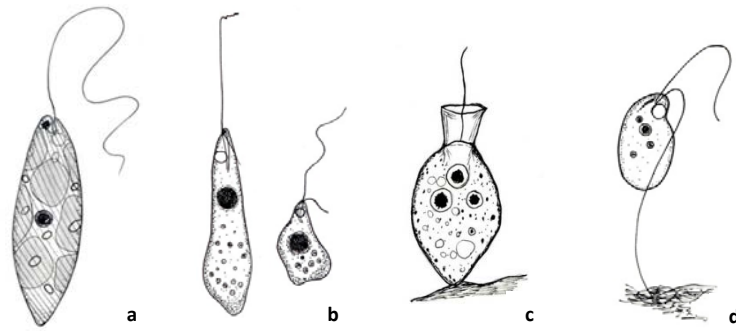


Figura 1.15. Características morfológicas más comunes del grupo de los flagelados. (a) *Euglena*. (b) *Peranema*. (c) *Monosiga*. (d) *Bodo*. Fuente: Pérez-Uz *et al.* (2008).

Los flagelados en general no son muy abundantes en fangos activados, excepto en fases de colonización o en condiciones de sobrecarga de las plantas. Probablemente, el grupo más común en fangos activos sea los bodonidos, llegando a ser muy abundantes en EDAR con eliminación de nutrientes (Pérez-Uz *et al.*, 2010).

La verdadera importancia de los flagelados en los sistemas de fangos activos ha sido probablemente subestimada, puesto que la mayoría se alimenta activamente de bacterias. Muchos son capaces de utilizar compuestos orgánicos solubles en competencia con las bacterias. Además, la última revisión detallada de flagelados en fangos activos fue realizada por Hänel (1979), siendo necesario el desarrollo de estudios más actuales sobre su papel en los sistemas más avanzados.

Amebas

Las amebas se caracterizan por la presencia de uno o varios pseudópodos que utilizan para el movimiento y la alimentación (fagocitosis). En la célula se puede observar el ectoplasma hialino y el endoplasma, donde se encuentran el núcleo, vacuolas contráctiles, vacuolas alimenticias, gránulos de reserva y otras inclusiones. Las amebas pueden presentar testas o caparazones (amebas testáceas) (figura 1.16a) o no (amebas desnudas) (figura 1.16b).

- Amebas desnudas
 - Amoebidae: amebas con uno (monopodiales) o varios pseudópodos (polipodiales) redondeados o tubulares. Por ejemplo, los géneros *Thecamoeba* y *Hartmannella* son monopodiales, mientras que *Amoeba* o *Mayorella* son amebas polipodiales de gran tamaño.

- Amebas testáceas. Emiten los pseudópodos a través de una apertura denominada opérculo.
 - Testáceas con pseudópodos anchos o lobópodos incluyen los géneros *Arcella*, *Centroplexis*, *Diffugia* y *Hyalosphenia*.
 - Testáceas con pseudópodos finos o filópodos incluyen los géneros *Euglypha* y *Trinema*.

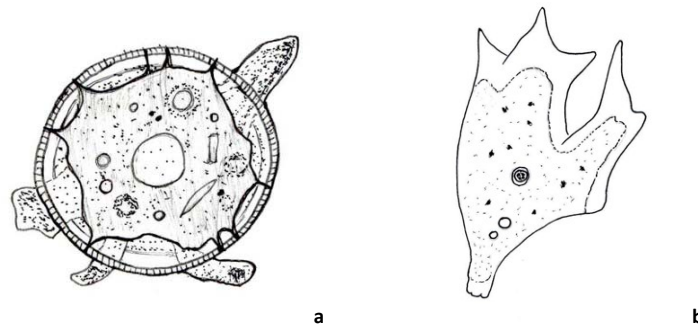


Figura 1.16. Características morfológicas de amebas desnudas y testáceas. (a) *Arcella*. (b) *Mayorella*. Fuente: Pérez-Uz *et al.* (2008).

Las mejores guías sobre amebas pertenecen a los siguientes autores: Ogden & Hedley (1980), Page (1988), Clarke (2003) y Smirnov & Brown (2004).

Tanto las amebas desnudas como las testáceas se encuentran bien representadas en los sistemas de fangos activos, sin embargo, son escasos los trabajos llevados a cabo sobre su identificación (Ramírez *et al.*, 1993). Ambas se encuentran normalmente presentes en bajas densidades, aunque en ocasiones pueden llegar a ser dominantes, por ejemplo; *Arcella* puede alcanzar densidades elevadas en sistemas en los que se elimina nitrógeno.

Ciliados

El grupo de los ciliados es considerado el dominante y más diverso de protistas en muchos sistemas de fangos activos, siendo por ello objeto de numerosos estudios. Los ciliados han sido divididos dentro de una serie de grupos ecológicos basados en sus hábitos de alimentación, modo de locomoción y localización física dentro de la biomasa. Según Curds (1968), Madoni (1991) y Madoni *et al.* (1994a) estos grupos funcionales son:

- Ciliados libres nadadores, nadando en el espacio interflocular (figura 1.17a).
- Ciliados reptantes, con el cuerpo aplanado, los cuales se desplazan sobre el flóculo (figura 1.17b).

- Ciliados sésiles, los cuales se encuentran adheridos al flóculo a través de estructuras de fijación como pedúnculos o caparazones (figura 1.17c).
- Ciliados carnívoros, los cuales se alimentan de otros protistas (figura 1.17d).

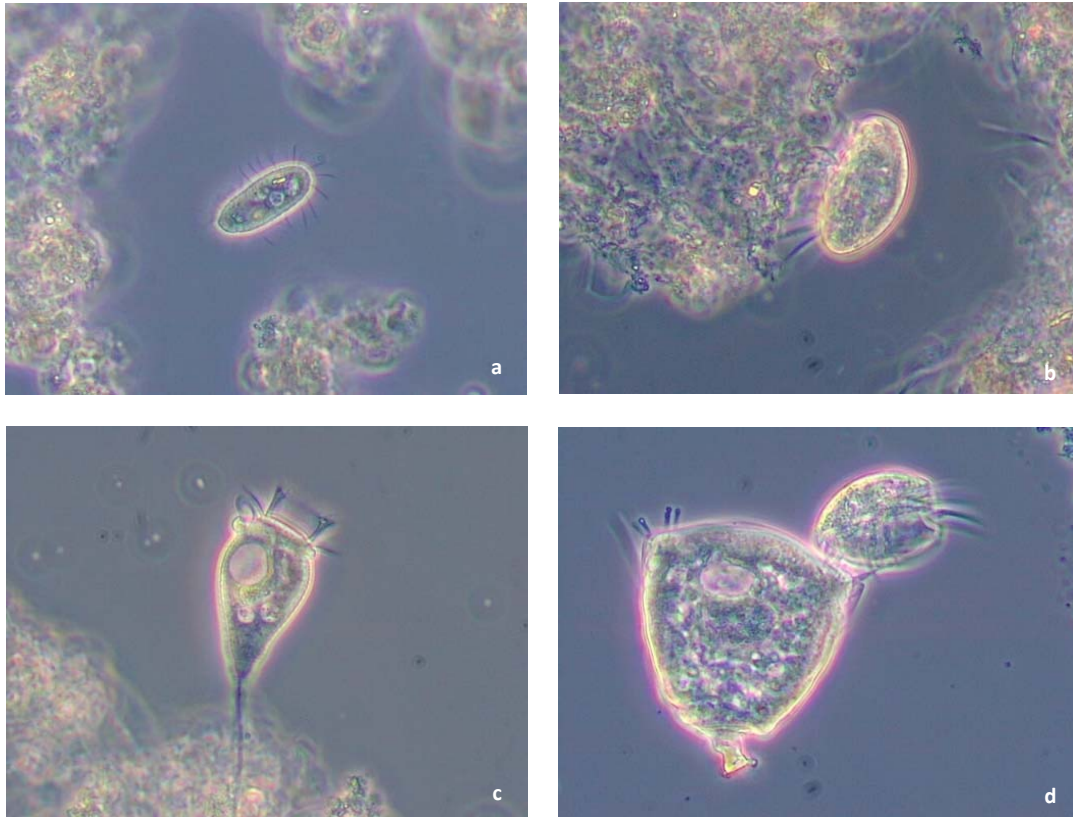


Figura 1.17. Grupos funcionales de ciliados. (a) Nadador; *Uronema* sp. Contraste de fases, (400x). (b) Reptante; *Aspidisca* sp. Contraste de fases, 400x. (c) Sésil; *Vorticella* sp. Contraste de fases, 400x. (d) Carnívoro; *Periacineta* sp. Contraste de fases, 400x. Autor: Andrés Zornoza.

Descripciones detalladas de la mayoría de los principales ciliados encontrados en fangos activos han sido presentados por Curds (1969), Foissner *et al.* (1991, 1992, 1994, 1995), Fernández-Galiano *et al.* (1996), Fialkowska *et al.* (2005), Curds *et al.* (2008) y Serrano *et al.* (2008a). La mayoría de organismos que aparecen en estas guías han sido observados en estaciones depuradoras situadas en distintos lugares de Europa. Se sabe poco acerca de la composición de dichos organismos en muestras de fangos activos de otras partes del mundo (Duchene, 1991; Horan, 1992), aunque en aquellos lugares donde se han realizado estudios los resultados sugieren que las comunidades de ciliados son similares (Pillai & Subrahmanyam, 1942; Morishita, 1970; Curds, 1975; Banina *et al.*, 1983; Chen *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008).

Se han registrado más de 200 especies de ciliados en muestras de fangos activos, de los cuales 175 han sido aceptados por Curds *et al.* (2008) como característicos de las aguas residuales. La identificación de ciliados se ha basado tradicionalmente en su morfología, implicando para ello la observación microscópica y en ocasiones fijación y empleo de técnicas de tinción. Los protocolos de las tinciones más comunes emplean compuestos con plata y Flutax. Esta última técnica, que utiliza microscopía de epifluorescencia, ha sido propuesta por Arregui *et al.* (2002, 2003) como una alternativa más fácil y simple a las tinciones clásicas de plata. La identificación a nivel de género es relativamente sencilla, sin embargo, la identificación a nivel de especie es a menudo difícil y problemática para personal no especializado, aun utilizando la bibliografía adecuada, como se demuestra en un análisis de concordancia realizado sobre indicadores biológicos en estudios interlaboratorios (Arregui *et al.*, 2012). Los avances en la tecnología han permitido en ocasiones salvar dicho inconveniente mediante el uso, por ejemplo, de sistemas semiautomáticos de identificación con tratamiento y análisis de imagen (da Motta *et al.*, 2001; Ginoris *et al.*, 2007) y a través de guías interactivas que utilizan una variedad de datos que incluyen secuencias de vídeos digitalizados (Fialkowska *et al.*, 2005; Curds *et al.*, 2008). Cada vez más se están utilizando métodos moleculares como herramientas de caracterización de la comunidad de ciliados, principalmente en estudios avanzados de protistas relacionados con el tratamiento de aguas residuales. Tales métodos incluyen el análisis del DNA de la comunidad total a través de técnicas como DGGE, T-RFLP y análisis comparativo de secuencias de clones de rDNA (Marsh *et al.*, 1998) y FISH (Fried *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2007).

Los ciliados más comunes en EDAR se pueden identificar según la disposición del citostoma y el tipo de infraciliación somática y oral, tal y como se expone a continuación (Rodríguez *et al.*, 2008):

- Heterotricos

- Células oblongas o aplanadas con el cuerpo celular contráctil debido a la presencia de mionemas.
- Ciliación somática (si está presente) homogénea.
- Ciliación oral constituida por numerosas membranelas en el lado izquierdo (zona adoral de membranelas, ZAM) y una membrana paroral más o menos desarrollada en el lado derecho del infundíbulo.
- Especies generalmente libre-nadadoras o temporalmente sésiles.

Entre los géneros más representativos se encuentran: *Blepharisma*, *Spirostomum* (figura 1.18a) y *Stentor*.

- Espirotricos

- Ciliación somática situada principalmente en el lado ventral aplanado, constituida por cirros (grupos de cilios) situados en la parte anterior, media y/o posterior.
- Ciliación oral constituida por numerosas membranelas en el lado izquierdo (ZAM) y una membrana o complejo paroral más o menos desarrollada en el lado derecho del infundíbulo.
- Especies reptantes asociadas al flóculo.

Entre los géneros más representativos de este grupo se encuentran:

- Hipotricos: *Euplotes* (figura 1.18b) y *Aspidisca*.
- Esticotricos: *Oxytricha*, *Stylonychia* y *Uroleptus*.

- Litostomados

- Cuerpo oblongo o aplanado lateralmente.
- Citostoma alargado en la parte anterior o lateral rodeado de tricocistos.
- Cinetias somáticas bipolares, a menudo ciliación somática desigual.
- Se alimentan de bacterias, flagelados e incluso otros ciliados.

Entre los géneros más representativos de este grupo se encuentran:

- Haptoridos: *Enchelys*, *Lacrymaria* y *Spathidium*.
- Pleurostomátidos: *Litonotus* (figura 1.18c) y *Acineria*.

- Filofaringeos

- Citostoma superficial, en algunos casos ausente, excepto en las formas larvales.
- Citofaringe pronunciada, a menudo reforzada por estructuras citoesqueléticas patentes (nemadesmos).
- Ciliación somática restringida a una de las caras del ciliado o totalmente ausente en las formas vegetativas.

Entre los géneros más representativos de este grupo se encuentran:

- Chilodonelidos: *Chilodonella* (figura 1.18d), *Pseudochilodonopsis* y *Tritbigmostoma*.
- Disteridos: *Trochilia*.
- Suctores (Filofaríngeos)
 - Ciliación somática ausente en las formas vegetativas. Larvas móviles con una franja aboral de cilios somáticos.
 - Tentáculos con toxicistos para la captura de presas (ciliados depredadores).
 - Pedúnculos de fijación (ciliados sésiles).

Entre los géneros más representativos se encuentran: *Podophrya* (figura 1.18e), *Tokophrya*, *Acineta*, *Periacineta* y *Multifasciculatum*.

- Oligohimenóforos
 - Ciliación somática homogénea o ausente en formas vegetativas sésiles.
 - Ciliación oral con tres membranelas o penículos en el lado izquierdo y una membrana paroral a la derecha.
 - Formas preferentemente nadadoras.

Entre los géneros más representativos de este grupo se encuentran:

- Peniculinos: *Paramecium*.
- Escuticociliados: *Cinetochilum*, *Uronema* y *Cyclidium*.
- Himenostomados: *Tetrahymena*, *Colpidium* y *Glaucoma*.
- Peritricos: *Vorticella*, *Carchesium*, *Zoothmanium* (figura 1.18f), *Epistylis* y *Opercularia*.

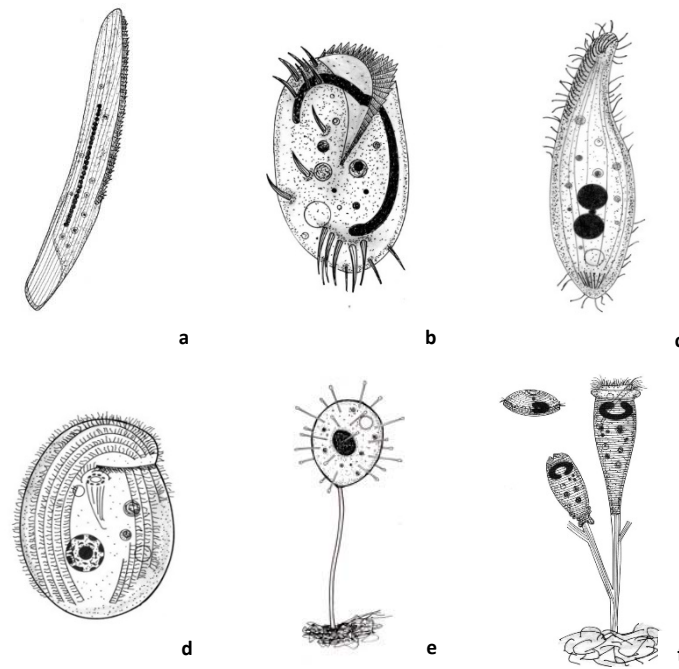


Figura 1.18. Características morfológicas de los protistas ciliados. (a) Heterotricos; *Spirostomum*. (b) Espirotricos; *Euplotes*. (c) Litostomados; *Litonotus*. (d) Filofaringeos; *Chilodonella*. (e) Suctores; *Podophrya* (f) Oligohimenóforos; *Zoothamnium*. Fuente: Pérez-Uz *et al.* (2008).

1.9.3 Los protozoos como bioindicadores del rendimiento del proceso de fangos activos

Desde la primera instalación de fangos activos a escala real en 1922 los primeros investigadores ya indicaron que los protistas eran potenciales indicadores de la eficiencia y rendimiento del proceso. Así, Arden & Lockett (1928, 1936) fueron probablemente los primeros en publicar tablas mostrando la relación de la calidad del efluente con determinados géneros de protistas, indicando cuatro categorías de eficiencias de plantas de fangos activos. Dichas tablas presentaron un valor limitado debido a que especies dentro de un mismo género podían reaccionar a las condiciones del medio de forma diferente (Lackey, 1938; Mohr, 1952; Baines *et al.*, 1953). Posteriormente se describieron las primeras asociaciones entre rendimientos de planta y comunidades de protistas (Lackey, 1938; Jenkins, 1942; Reid, 1969). Todas estas aportaciones preliminares culminaron con un estudio completo de la dinámica poblacional de dichos organismos, realizado por Curds & Cockburn (1970b) en 56 plantas de fangos activos en el Reino Unido, siendo probablemente el primer estudio relevante sobre protistas como bioindicadores de la calidad del efluente en plantas de fangos activos. Estos resultados fueron utilizados para crear un sistema de asociación el cual facilitaba la predicción del promedio mensual de la DBO₅ del efluente, basado en la identificación a nivel de especie de ciliados presentes en el licor mezcla. Dicho modelo fue probado en 34 lugares, encontrándose

una correcta predicción en el 83% de los casos. La mayor limitación de este modelo era que solo daba información de valores promedio mensuales de la DBO₅ y que requería la identificación a nivel de especie de hasta 34 organismos diferentes. Estas deficiencias fueron parcialmente rectificadas por Poole (1984), el cual examinó la microbiota de protistas del licor mezcla de 13 plantas de fangos activos con diferentes taxones. Al centrarse en taxones potencialmente indicadores y a su vez fácilmente identificables, permitió deducir con rapidez y exactitud las condiciones de operación de planta. A partir de sus resultados, Poole (1984) sugirió un modelo para optimizar la concentración de SSLM y el grado de aireación mantenida para alcanzar el rendimiento requerido en la planta. A partir de estos estudios, otros han continuado centrado sus objetivos en estudiar la relación entre la comunidad de protistas y la calidad del efluente y/o el rendimiento de la planta (Madoni & Guetti, 1981; Luna-pabello *et al.*, 1990; Al-Shahwani & Horan, 1991; Salvadó *et al.*, 1995; Martín-Cereceda *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2013b).

Las especies de protistas presentes en fangos activos han sido bien inventariadas como bioindicadores importantes desde el siglo pasado (Curds & Cockburn, 1970b; Madoni & Ghetti, 1981; Madoni *et al.*, 1991, 1993; Nicolau *et al.*, 2001). Gracias al potencial indicador de las condiciones de operación, algunos investigadores se han centrado en evaluar la relación entre protistas y parámetros operacionales (Esteban *et al.*, 1990, 1991a; Salvadó & Gracia, 1993; Salvadó, 1994; Martín-Cereceda *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2004; Dubber & Gray, 2011a; Hu *et al.*, 2012), y en el caso de algunos autores en diferentes tipos de procesos biológicos (Liu *et al.*, 2008).

Las relaciones descritas entre microorganismos y las variables de control del proceso han sido utilizadas por muchos investigadores para desarrollar métodos para la monitorización biológica del proceso de tratamiento del agua residual por fangos activos. En 1994, Madoni recopiló los conocimientos sobre ecología del fango activo (Curds & Cockburn, 1970b; Sladka & Sládeček, 1985; Al-Shahwani & Horan, 1991), y sus propias investigaciones (Madoni, 1991) y desarrolló el “Índice Biótico de Fango” (SBI, *sludge biotic index*), un índice biológico de control de la calidad del fango. El método propuesto se basa en la suposición de que la abundancia de ciertos grupos de protistas como los pequeños flagelados, las amebas testáceas y ciertos grupos de ciliados sésiles; reptantes, nadadores o depredadores, junto con algunas especies particulares de ciertas condiciones del sistema, varían dependiendo de las variables fisicoquímicas y operacionales, así como de los efectos en el proceso de tratamiento. Dicho método utiliza una tabla con dos entradas que permite definir la calidad del fango a través de un valor numérico (índice biótico) de 0 a 10, agrupados en cuatro clases de calidad. La clase I (fango muy bien colonizado y estable, excelente actividad biológica, muy buen rendimiento del proceso) incluye valores del SBI de 8 a 10, la clase II (fango bien colonizado y estable, actividad biológica en descenso, buen rendimiento) incluye valores de 6 y 7, la clase III (depuración biológica insuficiente en el tanque de aireación, rendimiento mediocre) incluye valores de 4 y 5, y la clase IV (mala depuración biológica, bajo rendimiento) incluye el resto de valores. A pesar de que existen otras propuestas de índices de calidad

en el fango (Burgess *et al.*, 2002; Jiang & Shen, 2003), el SBI es en la actualidad uno de los más utilizados en el control rutinario de las EDAR.

En la última década, algunos estudios se han centrado en demostrar la aplicabilidad del SBI. Así y a través del SBI, Samaras *et al.* (2009) investigaron la respuesta de la comunidad de protistas al cromo (VI) en el afluente (agua residual sintética). Por otro lado, Papadimitrou *et al.* (2007) investigaron los efectos de sustancias tóxicas (fenol, tiocianatos, cianuros) en la microbiota del fango activo, mientras que Nicolau *et al.* (2005) lo hicieron sobre la respuesta de la comunidad del fango a la adición de cobre en el agua residual sintética y real. Drzewicki & Kulikowska (2011) estudiaron el efecto de altas cargas orgánicas y de nitrógeno causadas por aguas residuales procedentes de tanques sépticos. Por último, Leal *et al.* (2013) valoraron su implementación en una EDAR del sector petroquímico.

Desde la entrada en vigor de la Directiva marco Europea de tratamiento de aguas residuales (91/271CEE), la cual especifica los límites máximos permitidos de nitrógeno y fósforo en efluentes que vierten a zonas sensibles, se ha producido un incremento creciente a lo largo de estos últimos años de nuevas EDAR con sistemas avanzados de eliminación de nutrientes o remodelación de los sistemas ya existentes. Para integrar la eliminación biológica de nutrientes se hace necesario incorporar ciclos anóxicos, aerobios y anaerobios con distintas estrategias de recirculación de fangos. Esto ha llevado a una creciente importancia del uso del SBR, que proporciona una buena operación temporal de dichos ciclos y excelente control del oxígeno y potencial redox en el fango activo (Carucci *et al.*, 1994; Gray, 2004; Hu *et al.*, 2005; Obaja *et al.*, 2005; Spagni *et al.*, 2007). Por lo tanto, a diferencia de sistemas de fangos activos convencionales, la microbiota en estos nuevos sistemas experimenta tensiones cinéticas y metabólicas derivadas de cambios de potencial, presentando características biológicas muy diferentes a las encontradas en los sistemas convencionales (Pérez-Uz *et al.*, 2007, 2009, 2010; Serrano *et al.*, 2008b; Liu *et al.*, 2008, Dubber & Gray 2011b) o nuevas tecnologías como los MBR (*membrane bioreactor*) (Arévalo *et al.*, 2009). Este hecho implica que los estudios anteriores sobre las plantas convencionales de fangos activos no puedan extrapolarse directamente a esta nueva tipología de EDAR, apareciendo por ello nuevos bioindicadores de la marcha del proceso (Pérez-Uz *et al.*, 2010; Dubber & Gray, 2011b).

Algunos estudios se han centrado en la búsqueda y uso de bioindicadores en EDAR y plantas piloto con aportes de aguas industriales procedentes del sector porcino (Puigagut *et al.*, 2009), con fenoles (Papadimitriou *et al.*, 2013), sector textil (Santos *et al.*, 2014). Otros estudios se han centrado en evaluar los efectos de sustancias tóxicas sobre la microbiota del fango activo, tales como el amonio (Puigagut *et al.*, 2005), metales pesados (Abraham *et al.*, 1997; Martín-González *et al.*, 2005; Nicolau *et al.*, 2005; 2007), ciclohexamida (Nicolau *et al.*, 2007), fenol, tiocianatos y cianuros (Papadimitriou *et al.*, 2007). Por último, algunos estudios particulares se han centrado en estudiar la dinámica de la comunidad de protistas durante episodios de *bulking* filamentoso (Hu *et al.*, 2013a).

1.9.4 Recuento de ciliados en fangos activos

Tal cual se ha indicado en el apartado anterior, los ciliados son utilizados como bioindicadores del rendimiento del proceso de fangos activos, siendo asociados con un amplio rango de variables fisicoquímicas y operacionales. Dichas referencias respecto a su potencial bioindicador se basan principalmente en la abundancia y diversidad de taxones.

La precisión en el recuento de ciliados se ha vuelto cada vez más importante en los estudios de investigación y en la monitorización de las EDAR (Nicolau *et al.*, 2001), utilizando la diversidad de ciliados para evaluar la eficiencia del sistema y la calidad del efluente tratado (Curds & Cockburn, 1970a, b; Madoni, 1994b; Burgess *et al.*, 2002). Sin embargo, el recuento de las poblaciones de ciliados no ha presentado especial interés en los estudios realizados (Dubber & Gray, 2009). Los investigadores han utilizado una variedad de enfoques respecto al recuento de ciliados, tanto en el volumen de muestra examinada como en el número de repeticiones, que varía ampliamente. Por ejemplo, en el estudio sobre el potencial bioindicador de los ciliados, Lee *et al.* (2004) utilizó el promedio de dos réplicas de 5 μL , mientras que Lee & Oleszkiewicz (2003) emplean una sola muestra de 20 μL en su estudio de predación de rotíferos sobre la población de bacterias nitrificantes. El promedio de dos muestras de 25 μL ha sido utilizado en numerosos estudios (Madoni, 1988, 1996, 2000; Puigagut *et al.*, 2007; Pérez-Uz *et al.*, 2010), mientras que Zhou *et al.* (2006) utilizaron tres réplicas de 25 μL de licor mezcla de la salida del reactor biológico. Dicho método fue también utilizado por Salvadó *et al.* (2001), examinando los efectos de choques de carga de NaCl sobre los protozoos en fangos activos y también por Martín-Cereceda *et al.* (1996), los cuales realizaron un estudio comparativo de las comunidades de ciliados en 10 EDAR de España. Tyagi *et al.* (2008) utilizaron el mismo volumen con un mínimo de cuatro réplicas en su estudio de comparación de plantas de aireación convencional y aireación prolongada. Diez réplicas de 50 μL fueron utilizadas por Chen *et al.* (2004) en su estudio comparativo de 5 EDAR de fangos activos en Beijing. Otros investigadores han optado por utilizar volúmenes de muestra más grandes (100 o 200 μL) para el recuento de ciliados (Papadimitriou *et al.*, 2007), mientras que Burgess *et al.* (2002) utilizó tres réplicas de 1000 μL . Madoni (1984) tomó distintas muestras procedentes de cuencas oligotróficas y de fangos activados con el fin de comparar los recuentos de las réplicas en función de distintos volúmenes de muestra (3,2, 10, 25, 50 y 100 μL). En base a los resultados obtenidos, recomendó utilizar cuatro réplicas de 25 μL para alcanzar una estimación total de la población del 25%, aunque el método no tiene en cuenta la necesidad de recuperar todas las especies presentes. Muchos investigadores han utilizado volúmenes de muestra de 25 μL , aunque son pocos los que han usado cuatro o más réplicas (Madoni *et al.*, 1996; Martín-Cereceda *et al.*, 1996; Madoni, 2000; Tyagi *et al.*, 2008).

Los ciliados no pueden conservarse ni mantenerse durante largos periodos de tiempo, por ello el examen microscópico debe realizarse lo antes posible (Madoni, 1984). Con el fin de reducir el riesgo de cambios significativos en el número de especies y su abundancia, se han recomendado varios periodos de tiempo máximo durante los cuales se debe realizar dicho examen. En la mayoría de estos estudios, las muestras han sido analizadas dentro de

las 3 horas (Al-Shahwani & Horan, 1991; Madoni *et al.*, 1996; Madoni, 2000; Chen *et al.*, 2004) o 5 horas (Madoni, 1984, 1994a), aunque Zhou *et al.* (2006) recomiendan que debería realizarse inmediatamente o antes de las 3 horas después de su recolección. Contrariamente, Abraham *et al.* (1997), que comprobaron los cambios en la estructura de la población de ciliados durante la conservación en frascos y en aireación durante más de 48 horas, no encontraron cambios significativos en el transcurso de las 24 horas después de la toma de muestras.

En la práctica, realizar el examen microscópico durante periodos cortos de tiempo (<3 horas) resulta especialmente complicado cuando: (a) las muestras proceden de distintos lugares, (b) la toma de muestras y análisis se realizan en diferentes localizaciones y (c) una misma persona es la responsable del examen microscópico y análisis diario de los parámetros fisicoquímicos. Por lo tanto, el conocimiento del tiempo durante el cual se producen cambios significativos en la comunidad de ciliados proporciona una mayor flexibilidad en el análisis sin comprometer la precisión (Dubber & Gray, 2009).

Dubber & Gray (2009) llevaron a cabo un estudio exhaustivo en dos EDAR con el fin de establecer el número de réplicas adecuado para recuperar el máximo número de especies, observar diferencias entre volúmenes de muestra de 20 y 25 μL y estudiar el efecto en la población de ciliados del tiempo de conservación. Sus resultados indican que el análisis de seis réplicas de 25 μL proporciona una excelente recuperación y estimación de la abundancia de las especies de las plantas estudiadas. Así mismo, recomiendan el examen microscópico antes de las 8 horas una vez tomada la muestra de fango activo.

1.10 Metazoos

Los metazoos son organismos holozoicos que se desarrollan a partir de embriones. Los gametos se forman dentro de órganos sexuales multicelulares o cuando menos en células somáticas circundantes. Los metazoos incluyen animales con una elevada diversidad, proponiéndose hasta 29 fila. De estos, solo se han reportado algunos en los sistemas de tratamiento de aguas residuales, que incluyen los siguientes grupos: rotíferos, nematodos, anélidos y gastrotricos (figura 1.18).

1.10.1 Rotíferos

Organismos de mayor tamaño que los protozoos (50-500 μm). Poseen un aparato digestivo complejo, que se caracteriza por presentar un órgano triturador llamado mastax. En función de la alimentación y al grupo de rotíferos la morfología del mastax puede variar, presentándose este como un carácter taxonómico importante. El filo *Rotifera* puede subdividirse en tres clases, de los que *Seisonidae* está constituido por organismos marinos. Las otras dos, Bdelloidea y Monogononta están ampliamente representadas en los procesos de tratamiento de aguas residuales, aunque en diferentes proporciones.

La clase *Bdelloidea*, p.ej. *Philodina* sp. y *Rotaria* sp., tienen un pie bien desarrollado con 4 y 5 o 6 apéndices, respectivamente. Aunque son capaces de nadar, propulsados por la agitación de una corona de cilios, su método habitual de movimiento es como el de un organismo reptante, lo que les facilita una competencia frente a los protistas ciliados, a los cuales se pueden equiparar ya que poseen un régimen bacterívoro. Son capaces de soportar largos periodos de desecación. Algunos Bdelloideos producen un quiste de protección cuando las condiciones ambientales son adversas, permaneciendo algunos en estado de enquistamiento durante largos periodos (3-4 años). Este grupo está particularmente bien adaptado para sobrevivir en lugares de condiciones ambientales cambiantes.

Monogononta abarca géneros que presentan todas las posibilidades en cuanto al desarrollo del apéndice. Puede estar completamente ausente, reducido y utilizado principalmente para adherirse más que para desplazarse (*Brachionus* sp.), o el pie es empleado principalmente para desplazarse (*Lecane* sp., *Notommata* sp.). En general, la familia predominante de Monogononta es *Brachionidae*, particularmente el género *Brachionus* (especie de apéndice reducido), que presenta cinco de las siete especies de esta familia. En el fango activo, donde hay mucho material en suspensión, la familia predominante de Monogononta es *Lecanidae*. Aunque solo sea morfológicamente, esta familia recuerda a *Brachionidae*, pues el género más importante en EDAR, *Lecane* sp., hace gran uso del apéndice durante la locomoción. Este rotífero es el reptante más frecuentemente hallado sobre las superficies de piedras o de algas filamentosas. Un estudio realizado por Fialkowska *et al.* (2008) indica la capacidad de reducción del número de filamentos de *Candidatus* 'Microthrix parvicella', mejorando las propiedades de sedimentación del fango. Otro género común en fangos activos perteneciente a esta clase es *Chephalodella* sp. Este puede alimentarse de pequeños agregados bacterianos, debido a la presencia de un mastax especializado (Doohan, 1975), pudiendo incluso depredar sobre la superficie del flóculo, lo que conlleva un efecto negativo sobre la dinámica poblacional de los reactores, especialmente de aquellos que mantienen altas edades de fango debido a que están diseñados para la eliminación de nutrientes o xenobióticos. Cech & Hartman (1993) demostraron un bajo rendimiento en un sistema de eliminación biológica de fósforo basándose en el desarrollo de rotíferos, alimentándose de bacterias con capacidad para acumular polifosfatos.

La alimentación de las especies más habituales en los sistemas de fangos activos se desarrolla o bien mediante filtración de bacterias dispersas y/o materia orgánica particulada (de la misma forma que los ciliados peritricos sésiles), proceso que se ve facilitado por la fijación al sustrato con el apéndice, o bien la alimentación se lleva a cabo ingiriendo pequeñas porciones de flóculos, consumiendo igualmente bacterias y materia orgánica. La eliminación de bacterias dispersas y materia orgánica por parte de los rotíferos contribuye a la formación del flóculo por la secreción de mucus, y por lo tanto, a la mejora de la sedimentabilidad del fango activo. Lapinski *et al.* (2003) demostraron el potencial de los rotíferos en el tratamiento del agua residual, con una reducción de la producción de biomasa y una mejora de la calidad del efluente. Chen *et al.* (2004) encontraron una asociación negativa de este grupo con la reducción de la DBO₅, DQO y eliminación de SST. En general, se les considera indicadores de un buen

funcionamiento del proceso de depuración, siempre y cuando no alcancen densidades excesivas. Una gran concentración de rotíferos indica un elevado tiempo de retención del fango (Fernández-Galiano *et al.*, 1996).

1.10.2 Nematodos

Los nematodos son organismos ampliamente distribuidos tanto en ambientes acuáticos como terrestres. En general, los nematodos de forma libre son muy similares en cuanto a apariencia. Presentan un cuerpo cilíndrico que se estrecha en ambos extremos (cuerpo fusiforme), con una longitud media en la mayoría de las especies de 0,5-3 mm. La boca se encuentra rodeada por papilas, continuando en una faringe musculosa que desemboca en el ano. Se alimentan de bacterias, materia orgánica y pequeños organismos. Son indicadores de elevadas edades del fango.

De los 10 ordenes reconocidos por Goodey solo están presentes en plantas de aguas residuales: Rhabditida, Enoplida (*Tobrilus*, *Tripyla*, *Monochus*), Dorylaimida (*Dorylaimus*), Araeolaimida (*Plectus*) y Monhysterida (*Monhysteria*). Las especies de los cuatro últimos ordenes mencionados solo se observan rara vez en las aguas residuales y son principalmente invasores casuales de los biotopos vecinos. Varias especies del orden Rhabditida son representantes habituales de las plantas de tratamiento de aguas residuales. Los componentes del orden Rhabditida se caracterizan por la posesión de un bulbo faríngeo terminal y la ausencia de glándulas caudales.

Dos subfamilias, Rhabditinae y Diplogasterinae, ambas pertenecientes a la familia Rhabditidae, engloban los principales representantes. Las características distintivas de estas dos subfamilias son: Rhabditinae se puede reconocer a través de la presencia de un bulbo faríngeo medial sin valvas, un bulbo terminal con valvas, estoma tubular y una estructura llamada “bursa” (la cutícula falta en la cola del macho). Los principales géneros que pertenecen a esta subfamilia son: *Rhabditis*, *Pelodera*, *Rhabditoidea*, *Caenorhabditis*, *Mesorhabditis* y *Rhabditonema*, todos ellos observados en aguas residuales. En la familia Diplogasterinae la colocación de las valvas faríngeas es de manera opuesta a la de Rhabditinae, pues en ella el bulbo medial presenta valvas pero no en el bulbo faríngeo. El estoma es variable, pero en muchos géneros son de gran tamaño y provistos de dientes. La estructura del estoma es la mejor característica diferencial de los distintos géneros, tales como *Mononchoidea*, *Diplogasteritus*, *Paroigolaimella*, *Demaniella*, *Fictor*, *Butlerius* y *Rhabditolaimus*.

Los nematodos se encuentran de forma habitual en la mayoría de los sistemas de tratamiento de aguas residuales, y concretamente en los sistemas aerobios (Scheimer, 1978). La abundancia de nematodos en sistemas de fangos activos generalmente representa menos del 1% de la microbiota, siendo su presencia limitada por el tiempo corto de residencia de la biomasa en el sistema (Salvadó, 1994). Colonizan sustratos sólidos como sedimentos y material fecal, de ahí que sea común encontrarlos en sistemas de soporte fijo (filtros percoladores y CBR). Algunos autores los han relacionado con el aumento de los valores de la DBO₅ en el afluente, y por lo tanto, con bacterias libres

debido a su alimentación bacterívora (Wooms *et al.*, 1987). Un papel atribuible a los nematodos en filtros percoladores sería el aumento de la difusión del oxígeno en la biopelícula, debido a su actividad y movimiento. A pesar de que estimulan el crecimiento bacteriano en biopelículas, los efectos de depredación observados en fangos activos parecen ser menos significativos (Wooms *et al.*, 1986, 1987). Debido a que necesitan altos tiempos para su desarrollo, su abundancia se relaciona con altas edades del fango o presencia de depósitos en el decantador o aireador (Duchene, 1991). Asimismo, son capaces de tolerar choques de cargas sin aparentes consecuencias a corto plazo, debido principalmente a su estrategia reproductiva y a la presencia de una fuerte cutícula.

1.10.3 Anélidos

Los anélidos, junto con tardígrados y gastrotricos, aparecen de forma ocasional en el fango activo (Klimowicz, 1970; Madoni *et al.*, 1993). Dentro de los anélidos presentes en fangos activos, el género más característico es *Aelosoma*. Este organismo tiene aspecto vermiforme, cuerpo segmentado y provisto de haces de sedas (3-4) o quetas en cada segmento de la zona dorsal. Como la mayoría de los oligoquetos, se corresponden con los organismos más grandes presentes en el sistema de fangos activos, con un tamaño de 1,5-4 mm. Es característico en este microorganismo la presencia de abundantes vacuolas de color rojizo o amarillento que contienen sustancias oleosas. Además, es frecuente su aparición, igual que el resto de los oligoquetos, en procesos que operan con elevadas edades del fango y durante etapas de nitrificación. Se alimentan de detritus, bacterias y algas. Algunos estudios han demostrado el uso de oligoquetos para reducir la producción del fango (Ratsak & Verkuijlen, 2006).

1.10.4 Gastrotricos

Los gastrotricos son organismos pluricelulares de tamaño comprendido entre 70-500 μm y de aspecto más próximo al de los ciliados que a los demás metazoos habituales en un sistema de fangos activos. Son organismos con cuerpos flexibles, usualmente con cilios locomotores, boca que se abre en la parte anterior y dos estructuras adhesivas posteriores. Los gastrotricos se dividen en dos clases: los macroclásidos de aguas marinas y salobres y los quetonótidos, de aguas dulces y del medio intersticial del fondo. Son organismos microscópicos de cuerpo alargado, provisto de cilios en su parte ventral, mientras que en la dorsal presentan escamas o ganchos. Además, es posible observar un extremo cefálico más o menos definido y un extremo caudal bifurcado, siendo translúcidos e incoloros. Carecen de sistema circulatorio y la respiración es cutánea. Además, el sistema nervioso lo forman dos ganglios cefálicos conectados entre sí de los cuales parten sendos nervios laterales que recorren todo el cuerpo. Poseen en la cutícula unos característicos tubos adhesivos que son estructuras glandulares asociadas con una musculatura propia, y que le sirven para fijarse al sustrato. Se alimentan, por succión de la faringe, de pequeñas partículas orgánicas, principalmente protozoos, bacterias y algas unicelulares. Son hermafroditas y copulan flexionando sus cuerpos. Los huevos, una vez fecundados, son liberados por rotura de la pared corporal.



Figura 1.19. Grupos principales de metazoos en sistemas de tratamiento de aguas residuales. (a) Rotífero. Contraste de fases, 100x. (b) Nematodo. Contraste de fases, 100x. (c) Anélido. Contraste de fases, 100x. (d) Gastrotrico. Contraste de fases, 400x. Autor: Andrés Zornoza.

1.11 Principales técnicas de ordenación multivariante empleadas en estudios de ecología

Desde el primer estudio importante publicado sobre protistas como bioindicadores de la calidad del efluente en plantas de fangos activos realizado en Reino Unido por Curds & Cockburn (1970b), han sido numerosos los esfuerzos en intentar relacionar las comunidades de protistas, metazoos y microorganismos filamentosos con las distintas variables fisicoquímicas y operacionales de las EDAR. Algunos autores han señalado que el éxito en la búsqueda de modelos de interpretación ambiental para explicar la dinámica poblacional de las variables biológicas de las EDAR se basa en tres aspectos fundamentales (Zornoza, 2015):

1. Constituir grupos multidisciplinares de investigadores (ingenieros de proceso, químicos, microbiólogos, etc.) que trabajen conjuntamente, y de esta forma, alcanzar un mayor conocimiento de los procesos biológicos.
2. Potenciar una simbiosis Universidad-Empresa que garantice el intercambio de experiencias y conocimientos entre ambas partes.
3. La elección adecuada de las herramientas numéricas para resumir y explorar estadísticamente grandes conjuntos de datos. No existe un método estadístico único para el tratamiento de los datos, sino una diversa lista de rutinas multivariantes a disposición del investigador como herramientas útiles para poder rechazar o confirmar sus hipótesis. Nadie conoce los datos mejor que el propio investigador, siendo por tanto el responsable último de la decisión de las técnicas estadísticas a emplear.

A continuación se exponen algunas consideraciones prácticas para el pretratamiento de los datos y la elección de rutinas exploratorias y de interpretación ambiental en el estudio de la dinámica poblacional de protistas, metazoos y microorganismos filamentosos.

1.11.1 Pretratamiento de los datos: los primeros pasos después de la fase experimental

El proceso de fangos activos es un proceso biotecnológico creado por humanos, cuyas reacciones bioquímicas son llevadas a cabo a través de los microorganismos en reactores biológicos sometidos a numerosas condiciones ambientales extremas, en comparación con aquellas que se dan en el medio acuático natural. Por ello, no deja de ser un ecosistema en el cual nos encontramos dos conjuntos de variables: las variables ambientales (denominadas explicativas o independientes) y las variables biológicas (denominadas respuesta o dependientes). Las variables biológicas representan los distintos taxones de protistas, metazoos y microorganismos filamentosos, mientras que las ambientales englobarían las variables operacionales y fisicoquímicas de las EDAR. Por tanto, siempre nos encontraremos en cualquier estudio de bioindicación con dos conjuntos de datos o matrices: variables biológicas x objetos (matriz respuesta) y variables ambientales x objetos (matriz explicativa). Los objetos pueden representar lugares o sitios (biorreactor) y/o una serie temporal (estaciones, meses, años, etc.).

Lo primero que el investigador debe plantearse antes de seleccionar cualquier tipo de tratamiento numérico son los objetivos, para posteriormente elegir de forma adecuada las rutinas multivariantes que le ayudaran a confirmar o rechazar sus hipótesis. Algunos de estos objetivos podrían ser:

- Estudio de la distribución espacial y/o dinámica temporal de las variables biológicas.

- Búsqueda de organismos bioindicadores para el control del proceso biológico, por ejemplo; protistas y metazoos bioindicadores del proceso de nitrificación.
- Búsqueda de las variables ambientales determinantes del crecimiento excesivo de microorganismos filamentosos.

Antes de comenzar a utilizar las distintas rutinas de análisis multivariante es importante explorar de forma descriptiva ambos conjuntos de datos, con el fin de conocer la matriz que posteriormente será utilizada con fines exploratorios y/o de interpretación ambiental. Entre las herramientas más extendidas se encuentran los clásicos estadísticos descriptivos: media, mediana, desviación estándar y rango (mínimo-máximo). Por otro lado, el diagrama de cajas y bigotes (*box plots*) permite visualizar la dispersión y simetría de los datos, representando los tres cuartiles, la mediana, el valor mínimo y máximo de los datos, así como los valores anómalos.

Establecer el *ranking* de frecuencia de aparición de las variables biológicas es muy útil para determinar los organismos más frecuentes y aquellos que podrían quedar excluidos en los análisis posteriores. A priori no existe ninguna regla definida de exclusión, siendo el propio investigador el que elegirá, si así lo considera, la frecuencia a partir de la cual serán consideradas las variables biológicas para su estudio.

Uno de los pasos más críticos y decisivos es sin duda el pretratamiento de los datos biológicos y ambientales, el cual si no se realiza de una forma adecuada puede alterar considerablemente los resultados de las rutinas multivariantes de exploración e interpretación ambiental (Ramette, 2007; Clarke *et al.*, 2014). La abundancia de las variables biológicas puede ser expresada en forma de frecuencia relativa (%) o densidad absoluta (ind/mL). Es muy común que determinados organismos presenten elevada abundancia respecto a otros, por ejemplo debido a que poseen distintas tasas de crecimiento. En estos casos se hace necesario transformar los datos biológicos para moderar la influencia de aquellos organismos muy abundantes y de esta forma dar mayor peso a los poco abundantes. Las cinco opciones más utilizadas en ecología microbiana en la transformación de datos biológicos son las siguientes (Clarke *et al.*, 2014):

1. Ninguna transformación.
2. Raíz cuadrada.
3. Raíz cuarta.
4. Log (X+1).
5. Transformación binaria (presencia/ausencia).

Conforme avanzamos de la opción 1 a la 5 le estamos dando menos influencia a los organismos muy abundantes y más a los menos abundantes. El investigador deberá elegir la transformación que considere más adecuada para el conjunto de datos biológicos. Existen algunas herramientas que pueden orientarlo a la hora de tomar decisiones, como por ejemplo, a través del cálculo de los coeficientes de correlación de Spearman entre las matriz distancia biológica y ambiental en la rutina BIO-ENV (Clarke *et al.*, 2014). Una vez seleccionada la transformación es interesante visualizar la abundancia de las variables biológicas a través del denominado trazado sombreado (*shade plot*), con el fin de valorar su efecto en el conjunto de datos.

Respecto a la matriz de variables ambientales, es muy común que algunas de ellas no presenten una distribución normal y simétrica, siendo necesario realizar una transformación (logarítmica, raíz cuadrada, etc.) para aproximar la normalidad y estabilizar así la varianza. La distribución de los datos puede ser valorada a través de diferentes gráficos, por ejemplo: cajas y bigotes, gráfico Q-Q, dispersión de puntos (*draftsman plot*) e histogramas de frecuencia, o a través de test numéricos, como el test de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. En la figura 1.19 se aprecia la ausencia de normalidad y simetría de la EF (a y c). Una vez trasformada con la función $\text{Log}(X+1)$, presenta simetría y distribución normal (5b y d).

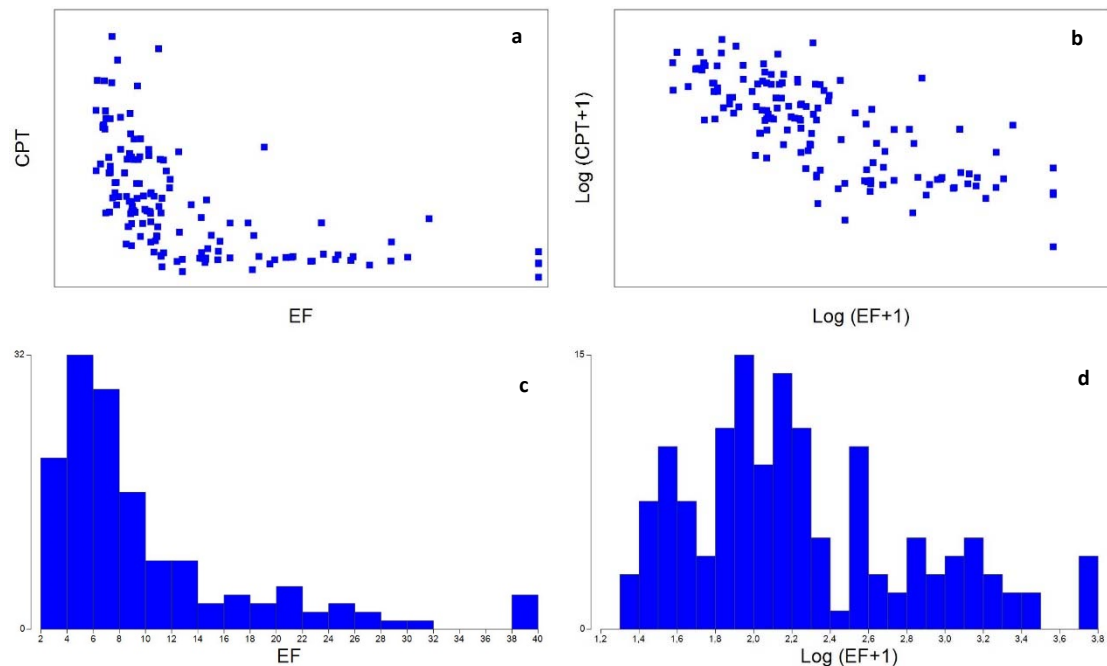


Figura 1.20. Gráfico de dispersión de puntos entre las variables EF y CPT, e histogramas de frecuencia de la EF. (a) y (c) Sin transformar. (b) y (d) Después de la transformación logarítmica. Fuente: elaboración propia.

Por último, señalar que es muy común encontrar diferentes escalas o unidades de medida en la matriz de variables ambientales, por ejemplo: mg/L, %, horas, días, Kg/Kg SSVLM.d. Bajo estas condiciones las escalas de medida no son comparables, especialmente en aquellos análisis basados en matrices distancia, siendo necesario eliminar dicha influencia a partir de un proceso de estandarización (denominado normalización en Primer v7), descrito ampliamente en Clarke *et al.* (2014) y Ramette (2007).

Una vez los datos biológicos y ambientales han sido examinados y preparados, podemos pasar a la siguiente fase: la exploración multivariante de ambos conjuntos de datos a través de técnicas de ordenación y clasificación.

1.11.2 Análisis exploratorio multivariante

El objetivo fundamental de los análisis exploratorios de ordenación y clasificación es representar la similitud y disimilitud entre objetos (p.ej. muestras, sitios) a partir de los valores de múltiples variables asociados con ellos (dispuestas en columnas), de forma que los objetos similares se encuentren representados cerca unos de otros y aquellos no similares se encuentren más separados. Por tanto, los análisis exploratorios son útiles para visualizar patrones de distribución de grandes conjuntos de datos, sin embargo no consiguen explicar la existencia de dichos patrones.

Análisis clúster. El análisis clúster o de conglomerados abarca varias técnicas de análisis multivariantes que se utilizan para agrupar los objetos en categorías, basados en sus similitudes o disimilitudes. El objetivo principal es minimizar la variación dentro del grupo y maximizar la variación entre los grupos, con el fin de revelar categorías bien definidas de objetos, y por lo tanto, reducir la dimensionalidad del conjunto de datos a unos pocos grupos de filas (James & McCulloch, 1990; Legendre & Legendre, 1998).

El análisis clúster de un conjunto de datos se realiza en dos pasos (Ramette, 2007). En primer lugar, se elige un coeficiente (similitud o disimilitud) para medir la asociación entre objetos o entre variables (ambientales o biológicas). En segundo lugar, la matriz distancia de asociación calculada se representa en forma de árbol horizontal o como grupos distintos de objetos. En ecología, el potencial de dicho análisis se deriva de la existencia de diferentes tipos de coeficientes de similitud y disimilitud (Clarke *et al.*, 2014). La elección apropiada de dichos coeficientes de asociación, ecológicamente significativos, es particularmente muy importante ya que afecta directamente a los valores que se utilizan posteriormente para categorizar los objetos. En el caso de explorar la relación entre objetos asociados a variables ambientales (operacionales, fisicoquímicas en las EDAR) es aconsejable utilizar la distancia euclídea, mientras que en el caso de las variables biológicas (protistas, metazoos y bacterias filamentosas) es más apropiada la distancia de Bray-Curtis (Clarke *et al.*, 2014).

Escalamiento multidimensional no métrico. El escalamiento multidimensional no métrico (nMDS, *non-metric multidimensional scaling*) es una técnica exploratoria multivariante de interdependencia que trata de representar en un espacio geométrico de pocas dimensiones las proximidades existentes entre un conjunto de objetos. El nMDS es un método de ordenación basado en la distancia entre pares de variables (matriz distancia), no siendo necesario el supuesto de normalidad multivariante del conjunto de datos. El nMDS es una técnica ampliamente utilizada en ecología para detectar gradientes en comunidades biológicas. Una de las ventajas es que permite, igual que el análisis de componentes principales (PCA, *principal component analysis*) reducir la dimensionalidad de los datos originales. El resultado de la ordenación se puede visualizar en un gráfico de dos dimensiones, donde el nivel de *stress* indica la bondad del ajuste. Dicho nivel no solo se incrementa cuando disminuye la dimensionalidad, si no también cuando se incrementa la cantidad de datos. Es muy útil la superposición del análisis clúster en el gráfico de ordenación del nMDS para detectar agrupaciones de objetos, así como la superposición de los vectores de correlación de Spearman de variables ambientales o biológicas para detectar gradientes.

Análisis de componentes principales. El PCA es uno de los análisis exploratorios más populares, debido quizás a que dicha técnica fue de forma generalizada el primer enfoque multivariante explicado en numerosos manuales de tratamiento estadístico de datos.

El procedimiento del PCA se basa en una técnica de reducción de dimensiones que calcula nuevas variables (componentes principales), que son combinaciones lineales de las variables originales, con el objetivo de explicar la mayor cantidad de varianza de los datos originales (Hotelling, 1933). El objetivo es representar los objetos (filas) y variables (columnas) del conjunto de datos en un nuevo sistema de coordenadas (generalmente en dos o tres ejes o dimensiones) donde puede ser representada la mayor cantidad de la variación del conjunto de los datos originales. En la práctica, el PCA se realiza a partir de una matriz de varianza-covarianza o una matriz de correlación.

Ramette (2007) sugiere que el PCA debería ser usado de forma general cuando los objetos cubren gradientes muy cortos y cuando las variables biológicas responden de forma lineal a los gradientes ambientales. Debido a que dichas condiciones no se dan con frecuencia en estudios de ecología, otros enfoques multivariante han sido utilizados de forma preferente, por ejemplo, el análisis de correspondencias (CA, *correspondence analysis*) (ordenación unimodal) o el nMDS. Otros autores indican que debido a la relativa inflexibilidad de la definición del PCA, limita su utilidad de forma práctica a la exploración de variables ambientales (Clarke *et al.*, 2014).

Análisis de coordenadas principales. El análisis de coordenadas principales (PCoA, *principal coordinate analysis*) es una rutina útil en la reducción de la dimensionalidad y representación visual de la distribución de objetos a partir de la matriz distancia (Gower, 1966). El PCoA es como el nMDS respecto a su flexibilidad, ya que puede basarse en cualquier matriz distancia (distancia euclídea, Bray-Curtis, etc.). Sin embargo, también es como un PCA, puesto que

se trata de una proyección de puntos en ejes que minimizan la variación residual en el espacio de la distancia elegida, que en el PCA se trata del espacio euclídeo.

A diferencia del PCA, el PCoA no proporciona un vínculo directo entre los componentes y las variables originales, siendo difícil la interpretación de la contribución de las mismas. Esto se debe a que los componentes del PCoA en lugar de ser combinaciones lineales de las variables, como el PCA, son funciones complejas de las variables originales en función de la medida de disimilitud seleccionada.

Los objetos son representados como puntos en el espacio de ordenación. Los valores propios (*eigenvalues*) también se utilizan para medir la cantidad de varianza explicada por las variables sintéticas en cada eje del PCoA. Aunque no hay una relación lineal directa entre los componentes y las variables originales, es posible correlacionar las puntuaciones de los objetos en los ejes principales con las variables originales y así evaluar su contribución a la ordenación.

El PCoA puede ser de utilidad para visualizar patrones de distribución de objetos cuando el nMDS presenta una baja dimensionalidad (nivel de stress mayor de 0,20) (Clarke *et al.*, 2014). Por otro lado, es interesante el cálculo de la variación total explicada en los 2 o 3 primeros ejes del PCoA de las variables biológicas para contrastarla con la variabilidad explicada por las variables ambientales en la aplicación de modelos lineales basados en la distancia (DISTLM, *distance-based linear models*). De esta forma podemos conocer si las variables ambientales elegidas en la rutina DISTLM son escasas o suficientes para explicar la variabilidad de la matriz distancia de las variables biológicas.

Análisis de correspondencias. Una de las cuestiones básicas que los ecólogos se plantean cuando se enfrentan a una tabla multidimensional de sitios (o muestras) y variables biológicas es si ciertos organismos aparecen en sitios específicos, como una medida de sus preferencias ecológicas. El CA tradicionalmente se ha utilizado en ecología microbiana para determinar si los patrones de distribución de las variables biológicas pueden establecer una diferenciación en la composición de la comunidad en función de las estaciones, origen geográfico o estructura del hábitat. El objetivo general de esta técnica consiste en comparar la correspondencia entre las muestras y organismos de una tabla de contingencia (o cualquier tabla de dimensión homogénea) y representarla en un espacio reducido de ordenación (Hill, 1974). De forma notable, en lugar de maximizar la cantidad de varianza explicada por la ordenación, el CA maximiza la correspondencia entre las puntuaciones de organismos y muestras.

El CA es una técnica muy popular entre los ecólogos, puesto que es especialmente recomendable cuando los organismos muestran relaciones unimodales (forma de campana) con los gradientes de las variables ambientales (ter Braak, 1985), como ocurre cuando un organismo se encuentra favorecido por valores específicos de una variable ambiental dada, aspecto observado a través de un pico de abundancia o presencia cuando se dan las condiciones

ambientales óptimas. Ter Braak & Prentice (1988) demostraron que el modelo unimodal, que apoya el concepto de nichos ecológicos, es un modelo adecuado para ordenar la mayoría de datos ecológicos.

Análisis de las diferencias significativas entre grupos. Además de representar objetos en un gráfico de ordenación o clasificación, otro objetivo puede ser comprobar si las diferencias entre los grupos de objetos (filas) en una tabla multivariante, basadas en el conjunto de sus atributos (columnas), son significativamente diferentes, por ejemplo, para probar si las similitudes dentro de los grupos son mayores que las existentes entre los grupos. Para ello pueden ser utilizados el análisis multivariante de la varianza permutacional (PERMANOVA, *permutational multivariate analysis of variance*), también llamado MANOVA no paramétrico (NPMANOVA), y el análisis de similitudes (ANOSIM, *analysis of similarity*).

Análisis multivariante de la varianza permutacional. El PERMANOVA es una rutina interesante para probar la respuesta simultánea de una o más variables en uno o más factores en un diseño experimental de análisis de la varianza (ANOVA) sobre la base de cualquier medida de semejanza, utilizando para ello métodos de permutación. La descripción completa puede consultarse en Anderson (2001a) y McArdle & Anderson (2001).

Esta rutina realiza una partición de la suma total de cuadrados según el diseño experimental completo especificado por el investigador, incluyendo el tratamiento apropiado de los factores que son fijos o aleatorios, cruzados o anidados (jerárquica), y todos los términos de interacción. La rutina calcula correctamente el estadístico pseudo-F (pseudo-t) a partir de la matriz distancia para cada término en el modelo, basado en las expectativas de la media de cuadrados, de manera que es directamente análoga a la construcción del estadístico F para los modelos de ANOVA multifactoriales (Cornfield & Tukey, 1956; Hartley, 1967; Rao, 1968). El valor-P se obtiene usando un procedimiento de permutación apropiado para cada término, siendo el investigador el que especifica si deben ser utilizados la permutación de datos brutos o residuales o un modelo completo o reducido (Anderson, 2001b; Anderson & ter Braak, 2003).

Análisis de similitudes. Este procedimiento no paramétrico se utiliza para el análisis de las diferencias significativas entre dos o más grupos, sobre la base de cualquier medida de distancia (Clarke, 1993). Compara los rangos de distancias entre grupos con rangos de distancias dentro de los grupos. Se comparan las medias de ambos tipos de rangos, y la resultante del test estadístico R mide si existe una separación entre grupos ($R=1$) o no ($R=0$). Valores de $R>0,75$ se interpretan como buena separación, $R>0,5$ como separados (pero superpuestos) y $R<0,25$ como apenas separados (Clarke *et al.*, 2014).

La rutina ANOSIM es muy útil cuando se emplea de forma complementaria con el nMDS, detectando si existen diferencias significativas y valorando la distancia (estadístico R) a partir de los factores definidos, por ejemplo:

biorreactor (factor espacial) y/o estacional (factor temporal). Además de poder evaluar individualmente cada factor (ANOSIM de una vía), es posible cruzar varios factores (ANOSIN cruzado de 2 y 3 vías).

1.11.3 Interpretación ambiental: rutinas multivariantes empleadas en el estudio de la relación entre variables biológicas y ambientales

Los análisis exploratorios pueden revelar la existencia de agrupaciones de objetos en un conjunto de datos. Cuando se dispone de una tabla o matriz complementaria de variables ambientales para dichos objetos, es entonces posible examinar si los patrones observados se encuentran relacionados con los gradientes ambientales. Los posibles objetivos pueden ser, por ejemplo, revelar la existencia de una relación entre la estructura de la comunidad y la heterogeneidad del hábitat, entre la estructura de la comunidad y la distancia en el espacio, o para identificar las principales variables ambientales que afectan a las comunidades de organismos.

En general, el nivel de significación de las relaciones entre las variables biológicas y variables ambientales puede ser evaluado mediante técnicas de permutación, como por ejemplo, el test de Monte Carlo. Este enfoque es particularmente adecuado cuando las variables no siguen una distribución normal (que es lo habitual con datos ecológicos), como tradicionalmente se requiere en procedimientos estadísticos tradicionales (Legendre y Legendre, 1998).

A) Análisis indirecto del gradiente

El modo en que influyen las variables ambientales en la composición biótica de los ecosistemas ha sido a menudo explorada de la siguiente forma: se utilizan técnicas de ordenación (como por ejemplo el PCA, AC, etc.) para resumir y representar los datos de la composición de la comunidad en un diagrama de ordenación, el cual es posteriormente interpretado según la información ambiental disponible mediante análisis de regresión múltiple de las variables ambientales sobre los ejes de ordenación. Esta aproximación en dos pasos se conoce como análisis indirecto del gradiente en el sentido utilizado por Whittaker (1967), ya que la interpretación ambiental es por lo tanto indirecta. Pero conlleva una serie de inconvenientes:

- Cuando las variables ambientales están fuertemente correlacionadas entre sí, o bien el número de variables se aproxima al número de unidades de muestreo, los coeficientes canónicos son inestables, no siendo posible conocer el aporte de cada una de las variables del estudio. Es el denominado problema de colinealidad (Carbonell *et al.*, 1983).
- Si las variables ambientales están pobremente correlacionadas con los primeros ejes de ordenación obtenidos en el primer paso del estudio, se pueden llegar a omitir las relaciones importantes.

B) Análisis directo del gradiente

Frente al análisis indirecto del gradiente se encuentran las técnicas que se engloban dentro de lo que se denomina análisis directo del gradiente. Con ellas se consigue relacionar de modo directo la variación en la composición de la comunidad con la variación ambiental (Gauch, 1982). Los primeros métodos más simples de análisis indirecto representaban cada valor de la abundancia de los organismos frente a valores de una variable ambiental. La realidad en ecología es muy distinta, ya que son muchas las variables ambientales condicionantes de las especies, además que siempre es deseable su efecto de forma conjunta. Con este propósito es posible utilizar el análisis de regresión múltiple, que a pesar de algunas aplicaciones acertadas nunca ha llegado a ser muy popular en estudios ecológicos. Algunas de las razones podrían ser:

- En ocasiones requiere un esfuerzo desmesurado, ya que cada organismo requiere un análisis por separado.
- En ningún caso los datos biológicos satisfacen la hipótesis de que la distribución de los errores sea normal, ya que a menudo son cualitativos, o cuando son cuantitativos contienen muchos valores cero para lugares en los cuales la especie está ausente.
- La abundancia de los organismos tiene a menudo un único máximo, función de las variables ambientales, con lo cual las relaciones entre variables biológicas y ambientales generalmente no son lineales.
- Las variables ambientales están a menudo altamente correlacionadas entre sí, siendo imposible los efectos independientes “problema de colinealidad” (Carbonell *et al.*, 1983).

Los modelos lineales generalizados (GLM, *generalized linear model*) dan una solución a los problemas de falta de normalidad y falta de linealidad en la relación entre variables biológicas y ambientales, pero sin embargo permanecen los problemas de que cada organismo requiere un análisis individual y el de colinealidad. Además, cuando el número de variables ambientales que influyan sea mayor de dos o tres, será difícil conseguir resultados para varios organismos conjuntamente con el objetivo de obtener un gráfico general que resuma las relaciones entre variables biológicas y ambientales.

A partir de lo expuesto anteriormente, se hace necesario el uso de métodos más complejos, englobados dentro de las técnicas de análisis directo del gradiente (análisis restringido). En el análisis de ordenación restringido (canónico), se muestra y se analiza solamente la variación en la tabla de las variables biológicas que puede ser explicada por las variables ambientales. Se supone que los gradientes son conocidos y representados a través de las variables medidas o sus combinaciones, mientras que la abundancia y ocurrencia de organismos son consideradas como una respuesta a dichos gradientes. Las ordenaciones restringidas se basan principalmente en modelos lineales multivariantes relativos a ejes principales de las variables ambientales observadas, dependiendo las diferentes técnicas de la tipología

de los datos (matriz o tabla), así como de la hipótesis subyacente de distribución de organismos (lineal o unimodal). Su objetivo es encontrar las mejores relaciones matemáticas entre la composición biótica y las variables ambientales medidas, y evaluar si estadísticamente dicha relación pueda ser debida a la casualidad, utilizando para ello las pruebas de permutación. Los diagramas de ordenación resultante representan muestras, especies y variables ambientales, de modo que las relaciones especies x muestras y especies x variables ambientales sean representadas tan fácilmente como sea posible a través de ángulos entre flechas y distancias entre puntos y flechas.

Análisis de redundancia. El análisis de redundancia (RDA, *redundancy analysis*) es un método basado en análisis propio (*eigenanalysis based-method*) y que puede ser considerado como una extensión del PCA, en el cual los ejes principales (componentes) están restringidos (*constrained ordination*) a ser combinaciones lineales de las variables ambientales (Rao, 1964). Para el RDA se utilizan dos tablas: una para los datos de las variables biológicas (dependientes o variables respuesta) y otra para las variables ambientales (independientes o variables explicativas). La regresión lineal múltiple es utilizada en este caso para explicar la variación entre las variables independientes y dependientes, realizándose dichos cálculos en base a un procedimiento iterativo para encontrar la mejor ordenación de los objetos. El interés de este enfoque es representar no sólo los principales patrones de variación de los organismos a través de las variables ambientales, sino también representar los coeficientes de correlación de cada organismo y cada variable ambiental en el conjunto de datos.

Análisis de correspondencias canónico. Ter Braak propone en 1986 el análisis de correspondencias canónico (CCA, *canonical correspondence analysis*) como método de análisis multivariante directo del gradiente. El CCA está considerado como una forma restringida del CA, lo que significa que la ordenación de los objetos representa solamente la estructura de los datos que maximiza la relación con una segunda matriz de variables explicativas. La matriz utilizada en el CCA no es solo la matriz de variables biológicas x objetos (matriz de variables dependientes), sino también una segunda matriz de variables ambientales x objetos (matriz de variables independientes). Ambas matrices se relacionan a través de análisis multivariante, conjuntamente con varias formas de análisis de correspondencias, obteniéndose una ordenación integrada de relación entre variables biológicas y datos ambientales. El fundamento del CCA es complejo y está explicado con todo detalle en ter Braak (1986, 1987).

Los ejes de ordenación son elegidos en el CCA en función de las variables ambientales, imponiendo la restricción adicional de que los ejes deben ser combinaciones lineales de las variables ambientales (ter Braak, 1988). De este modo, la variación de la comunidad de organismos se relaciona directamente con la variación ambiental. Los ejes pueden encontrarse mediante una extensión del algoritmo del PCA con un paso adicional donde se introduce la información procedente de la matriz de datos ambientales, de modo que la regresión no se realiza en un segundo

paso después de la ordenación (como ocurre en el análisis indirecto del gradiente), sino dentro del propio algoritmo de cálculo de los ejes.

Por tanto, el CCA se convierte en la técnica que selecciona la combinación lineal de las variables ambientales que maximiza la dispersión de las variables biológicas (ter Braak, 1987). Mientras que el CA es susceptible a lugares “pobres en especies” que contienen especies raras, de modo que estos se colocan como lugares aberrantes en los extremos finales del primer eje de ordenación (Gauch, 1982), el CCA no se ve afectado por este problema, de modo que los lugares que son aberrantes en cuanto a la composición de las variables biológicas no lo son tanto en términos de las variables ambientales.

En el CCA, la variabilidad explicada por los ejes de ordenación se encuentra representada por el término inercia (*inertia*). Hay una inercia total que representaría la variabilidad total de los datos y una devianza de la ordenación restringida (*constrained inertia*), que informa de la parte de la variabilidad total explicada por las variables explicativas (ambientales). Además, es interesante conocer qué proporción de dicha variabilidad queda explicada por cada uno de los ejes, teniendo en cuenta que habrá tantos ejes como variables explicativas incluyamos en el modelo, si bien generalmente la mayor parte de la variabilidad va a quedar resumida en los 2 o 3 primeros ejes.

El enfoque del CCA es muy similar al del RDA, excepto que el CCA está basado en una relación unimodal entre variables biológicas y ambientales y el RDA en una relación lineal (ter Braak, 1986). Este modelo parece ser robusto, incluso cuando algunos organismos muestran respuestas bimodales, intervalos o máximos desiguales a lo largo de gradientes ambientales, siendo por ello el método elegido por muchos ecólogos (ter Braak & Smilauer, 2002). Por tanto, está especialmente adaptado para la interpretación ambiental de las tablas de abundancia y ocurrencia de variables biológicas, adaptándose también a su ausencia en algunas unidades experimentales dentro del conjunto de datos. El CCA es sensible a los organismos raros presentes en ciertos lugares, reduciéndose el problema con ayuda de su ponderación (Legendre & Legendre, 1998).

La elección del modelo de respuesta lineal (PCA, RDA) o unimodal (CA, CCA) de las variables biológicas se puede realizar en base a la longitud del gradiente, siendo corto para el modelo lineal y largo para el unimodal. La longitud del gradiente, medido en unidades SD a lo largo del primer eje de ordenación, puede ser calculada a través del DCA (*detrended CA*) para la ordenación no restringida y del DCCA (*detrended CCA*) para la ordenación restringida. Ter Braak & Smilauer (2002) recomiendan el uso del modelo lineal cuando la longitud del gradiente se encuentra por debajo de 3 SD, aunque no necesariamente es la mejor elección si el objetivo es la aproximación del óptimo ambiental de las variables biológicas, utilizando para ello un modelo unimodal. Por otro lado, la teoría del análisis del gradiente, propuesta por ter Braak & Prentice (1988), establece el rango de 1,5-3 SD en el cual todavía pueden

ser usados indistintamente el RDA y el CCA. Para longitudes cortas del gradiente ($<1,5$ SD) el modelo lineal del RDA es el que mejor se ajusta, y el uso del CCA proporcionaría errores importantes.

Ordenación parcial. Es posible utilizar una ordenación parcial (p.ej. CCA parcial, RDA parcial) cuando se considera interesante evaluar los efectos de una variable ambiental después de eliminar los posibles efectos debidos a otras variables ambientales (ter Brack, 1988b). Este enfoque también se conoce como “*partialling out*” (control de efectos de variables específicas), las cuales son consideradas como covariables en el análisis restringido. Esta idea de controlar los efectos de las variables específicas se puede extender a evaluar los efectos de todo el conjunto de variables ambientales presentes en el estudio, con el fin de determinar la contribución relativa (cantidad de variación explicada) y la significancia de cada conjunto de variables sobre el total de la variación biológica.

Modelos lineales y análisis de redundancia basados en la distancia. El enfoque implementado por el DISTLM se denomina análisis de redundancia basado en la distancia (dbRDA, *distance-based redundancy analysis*), el cual fue acuñado por primera vez por Legendre & Anderson (1999) y más tarde perfeccionado por McArdle & Anderson (2001). Legendre & Anderson (1999) describieron el dbRDA como una regresión múltiple multivariante de los ejes del PCoA de variables explicativas, incluyendo una corrección en las situaciones en las que aparecen valores propios negativos. McArdle & Anderson (2001) perfeccionaron la rutina proporcionando un enfoque más directo, siendo el método implementado en el DISTLM y descrito de forma detallada por Anderson *et al.* (2008). Este nuevo enfoque no requiere el cálculo de los ejes del PCoA, ni ciertas correcciones sobre la presencia de valores propios negativos. La rutina DISTLM se utiliza para realizar particiones, probar hipótesis y construir modelos, mientras que la rutina dbRDA se utiliza para realizar una ordenación de los valores ajustados de un modelo dado. En la rutina dbRDA, la estructura de la nube de puntos se visualiza a través del modelo haciendo un análisis propio (*eigenanalysis*) ajustado de dicha nube. Mientras que en el PCoA la matriz distancia original es una ordenación sin restricciones (puesto que se examina la matriz distancia sola, libre de cualquier modelo o hipótesis específica), el dbRDA está limitado a encontrar combinaciones lineales de las variables independientes que explican la mayor variación en la nube de puntos.

DISTLM es una rutina muy interesante para analizar y modelizar la relación entre una nube de puntos de carácter multivariante, descrito por una matriz de semejanza y una o más variables explicativas. Por ejemplo, en ecología, la matriz distancia describe diferencias (o semejanzas) entre un conjunto de muestras sobre la base de datos de abundancia de organismos, siendo el interés determinar la relación entre dicha nube de puntos y una o más variables ambientales medidas para el mismo conjunto de muestras. La rutina permite que las variables explicativas se ajusten de forma individual o conjunta en grupos específicos. El valor-P, utilizado para probar la hipótesis nula de ausencia de relación, se obtiene utilizando métodos apropiados de permutación. La rutina DISTLM no sólo proporciona

medidas cuantitativas y pruebas de la variación explicada por una o más variables explicativas, sino que dispone de un conjunto de nuevas herramientas para la construcción de modelos y la generación de hipótesis. Con DISTLM pueden construirse modelos parsimoniosos utilizando diferentes criterios y procedimientos de selección del modelo. Previo a la exploración de modelos es imprescindible evaluar la multicolinealidad entre las variables explicativas, excluyendo del modelo aquellas variables con elevados coeficientes de correlación ($>0,85$) (Anderson *et al.*, 2008), aunque la decisión final de exclusión puede variar en función de los objetivos planteados. Por último, una vez construido un modelo determinado, este puede ser visualizado en el espacio multidimensional utilizando la rutina dbRDA.

Una de las características más atractivas del DISTLM en bioindicación de fangos activos es que permite la búsqueda de modelos parsimoniosos, es decir, simples y con un número muy reducido de variables ambientales (Zornoza, 2015). Además, la aplicación de esta rutina multivariante, de forma individual en biorreactores, permite extraer información muy interesante acerca de la capacidad bioindicadora de la comunidad de protistas y metazoos.

Análisis canónico de coordenadas principales. El objetivo del análisis canónico de coordenadas principales (CAP, *canonical analysis of principal coordinates*) es encontrar ejes a partir de la nube de puntos que: (i) sean los mejores a priori en la discriminación entre grupos de objetos (análisis discriminante) o (ii) que se correspondan con la mayor correlación con algún otro conjunto de variables. Esta rutina ha sido descrita por Anderson & Robinson (2003) y Anderson & Willis (2003), encontrándose su aplicación práctica e interpretación ampliamente desarrolladas por Anderson *et al.* (2008). El análisis puede realizarse en base a la elección de cualquier distancia. Con la rutina CAP, la cuestión principal es: ¿es posible encontrar un eje a través de la nube de puntos multivariantes que sea el mejor en la separación de los grupos?. La motivación principal del desarrollo de dicha rutina surgió de la constatación de que a veces hay a priori diferencias reales entre los grupos en el espacio multivariado que no se observan fácilmente utilizando rutinas de ordenación no restringidas (*unconstrained*), como son: el PCA, PCoA o nMDS.

Una de las grandes ventajas de la rutina CAP es que puede ser utilizada para la predicción en el contexto de la correlación canónica. Aquí, el criterio utilizado para la ordenación es encontrar el eje más fuertemente relacionado con una (o más) variables continuas (a diferencia de los grupos). El CAP podría considerarse como un enfoque preliminar del DISTLM, es decir, mientras que en este último nos preguntamos: ¿cuánta variabilidad en la nube de datos multivariantes puede ser explicada por la variable X?, en la rutina CAP nos preguntamos: ¿cómo de bien puedo predecir posiciones a lo largo del eje de X utilizando la nube de datos multivariantes?. Por lo tanto, la diferencia esencial entre los dos enfoques se encuentra en el papel de estos dos conjuntos de variables. DISTLM trata los datos multivariantes como una nube de datos de respuesta, mientras que en el CAP son considerados en

su lugar como predictores. De esta forma, es muy interesante su uso para relacionar variables biológicas con determinadas variables o gradientes ambientales (altura, profundidad, etc.).

1.12 Enfoques estadísticos utilizados para el estudio de la relación entre protistas, metazoos y bacterias filamentosas y variables ambientales en fangos activos

Uno de los primeros estudios que asociaron la comunidad de protistas y variables ambientales bajo un enfoque multivariante, fue probablemente el realizado por Esteban *et al.* (1991). En dicho estudio son asociadas 21 especies de ciliados con 19 variables fisicoquímicas, obteniendo 7 nuevos componentes a través del PCA. A partir de este estudio y hasta el momento, el PCA ha sido la técnica multivariante más utilizada para estudiar las relaciones entre microorganismos y variables fisicoquímicas y operacionales en las EDAR (Madoni *et al.*, 1993; Becarés, 1994; Martín-Cereceda *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2006, 2008; Liu *et al.*, 2008; Pérez-Uz *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2013b). Tal cual se ha señalado anteriormente, el PCA no se adapta bien a la mejor naturaleza de los datos biológicos, en el cual predominan abundantes valores cero, definiendo la disimilitud entre muestras de forma bastante inflexible a través de la distancia euclídea (Clarke *et al.*, 2014). Por ello, los resultados obtenidos mediante PCA deberían ser considerados como una primera exploración del conjunto de datos, puesto que no proporcionan una interpretación ambiental detallada de la relación entre variables dependientes (microorganismos) y variables independientes (variables ambientales). Además, para poder establecer la conveniencia de elegir entre un modelo lineal o unimodal se hace necesario previamente la estimación de la longitud del gradiente.

El análisis bivariado ha sido otra de las herramientas estadísticas elegida por la mayoría de investigadores del campo de la bioindicación en fangos activos para la exploración del conjunto de datos, a través de los coeficientes de correlación de Pearson y Spearman (Esteban *et al.* 1991; Madoni *et al.*, 1993, 1994b; Becarés, 1994; Martín-Cereceda *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004; Papadimitriou *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2006, 2008; Drzewicki *et al.*, 2011; Dubber & Gray, 2011a; Canals *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2014). En el caso del análisis bivariado, la relación encontrada no implica causalidad, y por lo tanto, no implica necesariamente que exista una relación directa significativa, permitiendo tan solo establecer asociaciones generales de forma preliminar. Por tanto, los resultados obtenidos a través del análisis bivariado deberían ser tenidos en cuenta como una primera exploración, ya que además de tratarse de relaciones lineales entre variables, estas pueden estar asociadas entre sí directamente o indirectamente en función del efecto de otras variables. Por ello, se hace necesario completar los resultados a través de técnicas multivariantes exploratorias y de interpretación ambiental.

En el caso de las técnicas exploratorias, estas han sido poco utilizadas a la hora de estudiar la estructura de la comunidad, como por ejemplo: el nMDS (Hu *et al.*, 2013b) y análisis clúster (Becarés, 1994; Liu *et al.*, 2008; Hu *et*

et al., 2013b). En algunos de los primeros trabajos de bioindicación algunos autores han empleado el análisis de regresión múltiple (Esteban *et al.*, 1990; Al-Shahwani *et al.*, 1991). En cambio, las técnicas de análisis directo del gradiente han sido elegidas en los últimos años por los investigadores, con el fin de estudiar la estructura de la comunidad en función de los gradientes ambientales. Muchas de estas técnicas se encuentran bien documentadas, empleando modelos lineales (RDA) (Hu *et al.*, 2012, 2013a) y modelos unimodales (CCA) (Papadimitriou *et al.*, 2013; Jaromin-Glen *et al.*, 2013; Leal *et al.*, 2013).

En el caso del estudio de las poblaciones de microorganismos filamentosos en fangos activos, estos se han centrado principalmente en el esclarecimiento de su posición taxonómica y ecofisiología *in situ*, ocurrencia y distribución geográfica, así como en el estudio de las medidas para su control. Probablemente, el escaso conocimiento taxonómico de las bacterias filamentosas, así como la falta de sondas moleculares para su identificación en muchos de los casos, hayan sido los principales motivos por el cual son pocos los trabajos publicados sobre interpretación ambiental de bacterias filamentosas en plantas depuradoras a escala real. Una de las principales referencias corresponde a Mielczarek *et al.* (2012), estudiando la dinámica poblacional de 28 plantas depuradoras a escala real en Dinamarca. Para establecer las relaciones entre variables biológicas (sondas moleculares) y variables ambientales (variables operacionales de planta) dichos autores hacen uso del análisis clúster y correlación, el análisis multivariante de la varianza y PCA. Por otro lado, algunos trabajos de investigación se han caracterizado por la larga duración (8 años) del estudio de los episodios estacionales de *foaming* causados por *Gordonia amarae*, utilizando un elevado número de variables de planta (48) y análisis de regresión y PCA (Frigon *et al.* 2006). Otros trabajos se han caracterizado por el elevado número de EDAR estudiadas (16) durante 2 años, empleando análisis bivariado y factorial para el estudio de las poblaciones de bacterias filamentosas y sus relaciones con las variables ambientales (Santos *et al.*, 2015). En el caso de los trabajos realizados en EDAR con eliminación de nutrientes, destaca el llevado a cabo por Miłobędzka *et al.* (2016), en el cual estudian los factores que afectan a las poblaciones de filamentos a partir de análisis de la varianza, bivariado y PCA.

El campo de la ecología microbiana en fangos activos está experimentando un gran cambio debido a la reciente aparición de modernas técnicas de biología molecular, como el análisis metagenómico, para el estudio de las comunidades de microorganismos en sus ambientes naturales, superando la necesidad de aislar y cultivar en el laboratorio a las especies individuales. El estudio del elevado número de variables biológicas obtenidas en metagenómica requiere del empleo de complejas técnicas exploratorias y de interpretación ambiental, lo cual a su vez está ocasionando que la ecología numérica adquiera una importancia creciente en el estudio de las poblaciones de microorganismos del fango activo. En este sentido, algunos estudios sobre la dinámica poblacional de bacterias filamentosas durante episodios de *bulking* y *foaming* han incorporado el análisis metagenómico, empleando técnicas

multivariantes de ordenación y clasificación (RDA, clúster) y análisis neuronal (Guo & Zhang, 2012; Wang *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2016).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Actualmente, los principales retos en el sector del tratamiento biológico de las aguas residuales implican la necesidad de avanzar en el control y optimización de los procesos, que permitan encontrar nuevas estrategias y/o nuevos sistemas de tratamiento para el ahorro de los costes de explotación y el cumplimiento de los objetivos de eficiencia energética y calidad en las EDAR. Además, las restricciones impuestas por la normativa en el vertido de ciertos contaminantes, como son el nitrógeno y el fósforo, obliga a las empresas del sector a realizar importantes modificaciones en el diseño de la planta. Por todo ello, cada vez es más necesario el conocimiento de la dinámica de las poblaciones microbianas que componen la comunidad biológica del sistema, empleando técnicas de identificación y cuantificación avanzadas y técnicas estadísticas multivariantes de exploración e interpretación ambiental. En base a estas necesidades, el objetivo general del presente trabajo es dilucidar las relaciones significativas entre variables biológicas (protistas, metazoos y bacterias filamentosas) y fisicoquímicas y operacionales que permitan una interpretación ecológica de los procesos que tienen lugar en los reactores biológicos, proponiendo así nuevas herramientas para la monitorización del proceso y el avance en el conocimiento de aquellos microorganismos filamentosos que causan problemas en las instalaciones.

Para el desarrollo del mencionado objetivo general, se han planteado una serie de objetivos específicos, los cuales se indican a continuación:

1. Exploración multivariante de las diferencias en la estructura de la comunidad de protistas, metazoos y bacterias filamentosas (variables biológicas) debidas a los factores biorreactor (espacial) y estacional (temporal). Determinación de las variables biológicas que contribuyen a la similitud y disimilitud entre los biorreactores estudiados.
2. Determinación de las correlaciones entre las variables biológicas y los factores biorreactor y estacional.
3. Estudiar la dependencia espacial y temporal del ciclo del nitrógeno en las EDAR estudiadas, determinando aquellos componentes del nitrógeno más correlacionados con ambos factores.
4. Construcción de modelos de ordenación ambiental simples, con un número reducido de componentes del nitrógeno del efluente y elevada capacidad de predicción, para la búsqueda de protistas y metazoos bioindicadores del proceso de eliminación del nitrógeno.
5. Determinación del valor bioindicador de protistas y metazoos respecto a los componentes que representan el rendimiento de eliminación del nitrógeno.

6. Exploración de la inercia biológica de las variables operacionales, a partir de la abundancia de protistas, metazoos y bacterias filamentosas.
7. Estudio de la variación de las variables ambientales (operacionales y fisicoquímicas del afluente y licor mezcla) respecto al patrón temporal (estacional) y espacial (biorreactor) en las EDAR estudiadas, determinando aquellas variables más correlacionadas con ambos factores.
8. Búsqueda de modelos de interpretación ambiental de la dinámica poblacional de protistas, metazoos y bacterias filamentosas a partir de la categorización de las variables ambientales, así como la combinación del conjunto de matrices individuales correspondientes a todos los biorreactores (matriz total).
9. Construcción de modelos simples de ordenación ambiental, con un número reducido de variables ambientales y elevada capacidad de predicción, para la búsqueda de protistas y metazoos bioindicadores del control del proceso biológico.
10. Comparación de la técnica convencional y la técnica FISH en la identificación y cuantificación de bacterias filamentosas, comparando a su vez sus características ecológicas.
11. Estudio de la influencia de las variables operacionales y fisicoquímicas en la dinámica poblacional de la comunidad de bacterias filamentosas, a partir de la búsqueda de modelos de interpretación ambiental.
12. Exploración de la relación entre la comunidad de bacterias filamentosas y los componentes del nitrógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Toma de muestras

Las muestras de fango activo fueron tomadas en cuatro depuradoras situadas en la Comunidad Valenciana (España): EDAR Cuenca del Carraixet (CX), EDAR Quart-Benàger (QB), EDAR Denia-Ondara-Pedreguer (DE) y EDAR Castellón (CT), cuyas características se describen a continuación. Las instalaciones depuradoras se consideran de interés para su estudio por presentar diferentes procesos biológicos y rendimientos del proceso de depuración, tratando tanto aguas residuales urbanas como industriales. Los esquemas de tratamiento se muestran en las figuras 18-21 del anexo.

EDAR Quart-Benàger (QB)

La depuradora de Quart-Benàger se ubica en la comarca de L'Horta Oest, dando servicio a los municipios de Alaquàs, Aldaia, Manises, Mislata, Quart de Poblet y Xirivella (figura 3.1). El proceso biológico utilizado es el Ludzack-Ettinger modificado de mezcla completa con eliminación de nitrógeno mediante aireación intermitente, compuesto por cuatro reactores en paralelo sin recirculación interna. El caudal medio anual es aproximadamente de 35 023 m³/día y la población servida de 166 942 habitantes equivalentes.



Figura 3.1. Vista aérea de la EDAR QB.

EDAR Cuenca del Carraixet (CX)

La depuradora Cuenca del Carraixet está ubicada en la comarca de L'Horta Nord, en el municipio de Alboria, dando servicio a diecisiete municipios colindantes (figura 3.2). El proceso utilizado es el Ludzack-Ettinger modificado de flujo en pistón con dos líneas de tratamiento en paralelo (A+B y C+D) sin recirculación interna, constituidas cada una de ellas por dos reactores también en paralelo. El efluente de los reactores de ambas líneas es mezclado previa a su entrada a los decantadores secundarios, de tal forma que el efluente final de la EDAR corresponde a la mezcla de ambas líneas. El caudal medio anual de la línea A+B es de $15.784 \text{ m}^3/\text{día}$, mientras que el correspondiente a la línea C+D es de $23.677 \text{ m}^3/\text{día}$. La población servida es de 178.080 habitantes equivalentes.



Figura 3.2. Vista aérea EDAR CX.

EDAR Dénia-Ondara-Pedreguer (DN)

La depuradora Dénia-Ondara-Pedreguer se ubica en la provincia de Alicante, en la comarca de la Marina Alta y da servicio a los tres municipios que indica su nombre (figura 3.3). Se trata de un sistema con tres reactores dispuestos en serie y en régimen de oxidación total con eliminación del nitrógeno mediante alternancia de zonas anóxicas y óxicas, así como control del sistema de aireación por lógica difusa. El caudal medio anual es de aproximadamente $19\ 089 \text{ m}^3/\text{día}$ y la población servida de 45 152 habitantes equivalentes.



Figura 3.3. Vista aérea de la EDAR DN.

EDAR Castellón de la Plana (CT)

La EDAR de Castellón de la Plana se encuentra localizada en la comarca de la Plana Alta en la provincia de Castellón, abasteciendo únicamente a dicha población (figura 3.4). El proceso utilizado es el Ludzack-Ettinger modificado de flujo en pistón con dos líneas de tratamiento en paralelo (CT1 y CT2), constituidas cada una de ellas por dos reactores también en paralelo sin recirculación interna. Ambas líneas se mantienen totalmente separadas a lo largo de toda la instalación. El caudal medio anual de la línea 1 es de aproximadamente de 21 837 m³/d, mientras que el correspondiente a la línea 2 es de 12 320 m³/día. La población servida es de 193 773 habitantes equivalentes. En la superficie de los reactores hay instalados generadores de ozono para el control de espumas de origen biológico.



Figura 3.4. Vista aérea de la EDAR CT.

Las muestras del afluente, efluente y licor mezcla fueron tomadas durante un año con una frecuencia quincenal desde diciembre de 2008 hasta diciembre de 2009. En la EDAR QB se tomó además una muestra adicional en enero de 2010. En la figura 3.5 se ha representado el esquema de cada muestreo, indicando su duración, origen y tipo de muestra empleada. La duración de cada uno de los muestreos quincenales fue de cuatro días repartidos de la siguiente forma: en los tres primeros días (1, 2 y 3) se muestreó afluente al reactor, mientras que en el tercer día (3) se muestreó, además, efluente del decantador secundario. Las muestras fueron compuestas, obtenidas a partir de la mezcla de muestras simples horarias en relación al caudal afluente de cada una de las EDAR. En el cuarto día (4) se tomaron muestras puntuales del licor mezcla en los reactores biológicos. En el caso de la EDAR DN, la muestra fue simple a la salida del tercer y último reactor dispuesto en serie. En el caso de la EDAR QB, la muestra fue integrada a partir de la mezcla a partes iguales de muestras simples tomadas al final de cada uno de los cuatro reactores dispuestos en paralelo. Por último, en cada una de las líneas independientes de las EDAR CX y CT (CXAB y CXCD, CT1 y CT2) se obtuvieron muestras integradas a partir de la mezcla a partes iguales de las muestras simples tomadas en los dos reactores en paralelo que componen cada una de las líneas. Durante todo el periodo de estudio fueron procesadas un total de 140 muestras de licor mezcla y efluente del decantador secundario, mientras que del afluente al reactor biológico fueron un total de 420 muestras.

Tabla 3.1. Esquema de los muestreos.			
Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Afluente al reactor		Afluente al reactor y efluente decantador secundario	Licor mezcla
Muestra compuesta (horaria)			Simple (puntual) / Integrada

3.2 Variables fisicoquímicas

Los días 1 y 2 se analizaron en el afluente al reactor la DQO, DQO soluble (DQOs) y DBO₅, mientras que el día 3 se llevó a cabo un análisis fisicoquímico completo del afluente y efluente, según se detalla en la tabla 3.1. El objetivo del primer análisis fue estudiar la inercia de la carga orgánica en los reactores biológicos y del segundo determinar el rendimiento del proceso biológico. El día 4 se procedió al análisis de las variables fisicoquímicas del licor mezcla, indicadas en la tabla 3.2. Todas las variables fisicoquímicas fueron determinadas siguiendo los procedimientos normalizados (APHA, 2005). La fracción soluble (s) de algunas variables fue obtenida a través de un filtro de 0,45 μm (Grady, 1989). La DBO₅ fue medida por respirometría usando el sistema Oxitop® (Reuschenbach *et al.*, 2003), inhibiendo el proceso de nitrificación mediante la adición de 0,5 mg/L de alitiourea (ISO, 2003). El ensayo de la V30 del fango activo, el índice volumétrico del fango a los 30 minutos (IVF30) y su forma diluida fueron calculados

según los procedimientos descritos en Jenkins *et al.* (2004). Además, se determinaron las mismas variables a los 5 minutos del inicio del ensayo de la V30, calculando así el IVF5.

Tabla 3.2. Esquema de los parámetros fisicoquímicos determinados en el afluente al reactor y efluente del decantador secundario.

Parámetros	Abreviatura	Ud	Afluente al reactor		Efluente dec. secundario
			Día 1, 2	Día 3	Día 4
pH	-	Ud.	-	x	-
Conductividad	-	$\mu\text{S}/\text{cm}$	-	x	-
Sólidos en suspensión totales	SST	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 biológica de oxígeno a los 5 días	DBO ₅	mg/L	x	x	x
Nitrógeno total	NT	mg/L	-	x	x
Nitrógeno total soluble	NTs	mg/L	-	x	x
Nitrógeno kjeldhal total	NKT	mg/L	-	x	x
Nitrógeno kjeldhal total soluble	NKTs	mg/L	-	x	x
Nitrógeno amoniacal	N-NH ₄ ⁺	mg/L	-	x	x
Nitrógeno nítrico	N-NO ₃ ⁻	mg/L	-	-	x
Nitrógeno nitroso	N-NO ₂ ⁻	mg/L	-	-	x
Fósforo total	PT	mg/L	-	x	x
Fósforo total soluble	PTs	mg/L	-	x	x
Fósforo del ortofosfato	P-PO ₄ ³⁻	mg/L	-	x	x
Tensioactivos aniónicos	TA	mg/L	-	x	-
Níquel	Ni	mg/L	-	x	-
Zinc	Zn	mg/L	-	x	-
Sulfatos	SO ₄ ²⁻	mg/L	-	x	-
Sulfuros	S ²⁻	mg/L	-	x	-
Proteínas	Prot	mg/L	-	x	-
Carbohidratos	Carb	mg/L	-	x	-
Ácidos graso volátiles	AGV	mg/L	-	x	-
Aceites y grasas	AG	mg/L	-	x	-

Tabla 3.3. Esquema de los parámetros fisicoquímicos determinados en el licor mezcla.

Parámetros	Abreviatura	Ud	Licor mezcla
			Día 4
pH	pHLM	Ud.	x
Conductividad	CondLM	$\mu\text{S}/\text{cm}$	x
Temperatura en el reactor biológico	T _{ar}	°C	x
Sólidos en suspensión del licor mezcla	SSLM	mg/L	x
Sólidos en suspensión volátiles del licor mezcla	SSVLM	mg/L	x
V30	V30	ml/L	x
Índice volumétrico del fango a los 30 minutos	IVF30	ml/g SSLM	x
Índice volumétrico del fango a los 5 minutos	IVF5	ml/g SSLM	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	DQOLM	mg/g SSVLM	x

3.3 Variables operacionales

Las variables operacionales de control del proceso biológico utilizadas en el presente estudio han sido las siguientes: carga másica (CM), edad del fango (EF) y tiempo de retención hidráulico en el reactor (TRHr) y decantador secundario (TRHds). Con el objetivo de estudiar la inercia de las variables operacionales en el proceso biológico, se han calculado nuevas variables promedio de la CM, TRHr y TRHds (tabla 3.3). La EF se ha calculado a partir del sumatorio de sus variables correspondientes hasta los siete días anteriores a la toma de muestras del licor mezcla (día 4), según sugieren Zornoza *et al.* (2011). De esta forma, se obtuvieron para su estudio siete expresiones distintas de la edad del fango (EF1-EF7). Todas las variables operacionales, a excepción del oxígeno disuelto en el reactor (OD) han sido determinadas según Tchobanoglous *et al.* (2003). Los valores del OD se han tomado mediante medidores en línea en los reactores biológicos. En la EDAR QB y CX se registraron los valores del OD al final de cada uno de los cuatro reactores dispuestos en paralelo, mientras que en la EDAR CT fueron registrados los valores en la parte inicial, central y final de todos los reactores. Por último, en la EDAR DN fueron registrados los valores en cada uno de los tres reactores dispuestos en serie. Los valores del OD fueron distribuidos en tres rangos (<0,8, 0,8-2 y >2 mg/L) y expresados en porcentaje de tiempo a partir de cada uno de los tres días anteriores a la toma de muestras del licor mezcla.

Tabla 3.4. Esquema de los parámetros operacionales utilizados.

Parámetro	Símbolo variable	Unidades	Observaciones
Tiempo de retención hidráulico en el reactor	TRHr3, TRHr1, TRHr2a, TRHr2b	horas	TRHr1: día3 TRHr2a: promedio días 2 y 3 TRHr2b: promedio días 1 y 2 TRHr3: promedio días 1, 2 y 3
Tiempo de retención hidráulico en el decantador secundario	TRHds3, TRHds1, TRHds2a, TRHds2b	horas	TRHds1: día3 TRHds2a: promedio días 2 y 3 TRHds2b: promedio días 1 y 2 TRHds3: promedio días 1, 2 y 3
Carga másica	CM1, CM2a, CM2b, CM3	kg DBO ₅ /kg SSVLM.d kg DQOs/kg SSVLM.d	CM1: día3 CM2a: promedio días 2 y 3 CM2b: promedio días 1 y 2 CM3: promedio días 1, 2 y 3
Edad del fango	EF1, EF2, EF3, EF4, EF5, EF6, EF7	días	EFX, donde X es el n ^o días anteriores utilizados en el sumatorio de las variables
Oxígeno disuelto del reactor	ODb, ODm, ODa	%	ODb: <0,8 mg/L ODm: 0,8-2 mg/L ODa: >0,8 mg/L

Además, en la EDAR CT fueron registrados los valores de la carga de ozono (CO_3), medida en $\text{Kg O}_3/\text{día}$, en ambas líneas (CT1 y CT2) y durante los tres días previos a la toma de muestras del licor mezcla.

3.4 Variables biológicas

3.4.1 *Protistas y metazoos*

La identificación y cuantificación de protistas y metazoos de las muestras de fangos activos recogidas se realizaron en un intervalo de tiempo máximo de 24 horas, normalmente antes de las 8 horas, después de la toma de muestras. Las observaciones se realizaron utilizando un microscopio de contraste de fases Zeiss, modelo Axiostar.

La estimación de la densidad absoluta de protistas y metazoos se llevó a cabo mediante recuento directo de dos alícuotas de 25 μL (Madoni, 1988), utilizando cuatro réplicas adicionales para el recuento de ciliados sésiles coloniales, según recomiendan Dubber & Gray (2009). La densidad fue expresada en individuos (ind)/mL. Para la estimación de la densidad de pequeños flagelados se examinaron dos réplicas en la diagonal de la cámara Fuchs Rosenthal, tomando un volumen de 25 μL (Madoni, 1988).

Los organismos fueron identificados en vivo utilizando las claves propuestas por Foissner *et al.* (1991, 1992, 1994, 1995, 1996), Fernández-Galiano *et al.* (1996), Rodríguez *et al.* (2008) y Serrano *et al.* (2008a). La identificación de protistas se completó utilizando la técnica de impregnación argéntica (Fernández-Galiano 1976, 1994) y la tinción con Flutax-2 (Arregui *et al.*, 2003). Se consideraron dos grupos de amebas desnudas según el tamaño celular, amebas grandes ($>50 \mu\text{m}$) y pequeñas ($<50 \mu\text{m}$).

- Tinción mediante impregnación argéntica

Las impregnaciones argénticas ponen de manifiesto los individuos, que se tiñen de un color “coñac”, así como los núcleos y la infraciliación somática y oral, que se observan teñidos en marrón oscuro. Esta técnica compleja se emplea con fines científicos (clasificaciones taxonómicas precisas a nivel de especie). Su empleo en instalaciones de depuración en ocasiones es limitado dada la relativa complejidad del procedimiento.

La técnica que mejores resultados ha demostrado dar es la desarrollada por Fernández-Galiano (1994), debido a su rapidez. A continuación se indica el procedimiento utilizado para la tinción en aguas residuales.

Procedimiento

- Mezclar en un vaso de precipitados de 50 mL las siguientes cantidades: 0,5 mL de muestra + 3-4 gotas de formol (40%) + 2 mL de Tween 80 al 5% + 20-25 gotas de bactopectona + 10 gotas de piridina pura + 2-3 mL de solución de carbonato plata amoniacal + 30 mL de agua destilada. En primer lugar se introduce en un vaso de precipitados pequeño el formol y la muestra y se diluye hasta 5 mL con agua destilada, a continuación se añade la bactopectona y la piridina, añadiendo el resto del agua destilada.
- Poner el vaso de precipitados con la mezcla al baño maría a 60 °C hasta que su contenido vire a color caramelo (aproximadamente 10 minutos). En muchos casos la muestra puede tomar un color mucho más oscuro.
- En un vaso de precipitados o una cápsula de 150 mL con 50 mL de agua destilada a temperatura ambiente, vaciar la muestra procesada.
- Dejar reposar durante 15 minutos y decantar. Volver a rellenar con 100 mL de agua destilada.
- Depositar muestra sobre portaobjetos para su observación al microscopio.

- Tinción Flutax-2

La identificación de las especies de ciliados se basa, fundamentalmente, en la caracterización de su patrón cortical, constituido fundamentalmente por estructuras microtubulares que tradicionalmente se ha puesto de manifiesto mediante técnicas de impregnación argéntica. Ciertos colorantes tienen la propiedad de emitir fluorescencia al ser iluminados con una determinada longitud de onda, característica que puede ser utilizada para la fabricación de sondas que permitan la visualización de determinadas estructuras celulares. Así, el Flutax, derivado fluorescente del taxol, cuya diana son los microtúbulos, puede utilizarse como un método alternativo, sencillo y eficaz, para la identificación de las especies de ciliados implicados en los procesos biológicos de tratamiento de aguas residuales (Arregui *et al.*, 2002, 2003).

Procedimiento

- Transferir una alícuota de la muestra de agua residual (500 µL aproximadamente) a un porta con tres depresiones.
- Permeabilizar las células añadiendo saponina al 0,5% (en tampón PHEM). Se trata de una permeabilización suave que evita que las células se rompan.

- Tras unos 10-15 segundos, fijar las células con una o dos gotas de paraformaldehído (al 2% en tampón PHEM). Son suficientes unos pocos segundos de fijación.
- Poner una gota de Flutax (2 μM en tampón PBS) sobre un porta limpio.
- Transferir con una micropipeta un volumen aproximado de 10 μL de la muestra a la solución del taxoide fluorescente.
- Poner el cubre con cuidado y observar la preparación en un microscopio de epifluorescencia usando un objetivo de 63x.

3.4.2 *Bacterias filamentosas*

Identificación mediante la técnica convencional

La identificación y estimación de la abundancia de los morfotipos filamentosos se realizó antes de las 48 horas posteriores al muestreo del fango activo, siguiendo las recomendaciones de Rodríguez *et al.* (2005) para la correcta manipulación y conservación de las muestras recogidas. Para su identificación se utilizaron las características morfológicas y estructurales descritas por Eikelboom (2000, 2006), Jenkins *et al.* (2004) y Rodríguez *et al.* (2008), utilizando además las tinciones de Gram, Neisser, PHA, azufre y vainas, también detalladas en estos manuales.

- Tinción de Gram

Se trata de una técnica de tinción diferencial que permite distinguir entre bacterias Gram+ y Gram-, en función del grado de permeabilidad de las paredes celulares al disolvente aplicado durante la tinción. Los filamentos Gram+ se observan de color azul y los Gram- de color rosado.

Reactivos

Solución I (A+B). Las soluciones A y B se mezclan en el momento de ser utilizadas y se desechan a las 24 horas. Por separado, la duración máxima de cada una es de 1 mes. (A) Solución de cristal violeta: 20 mL de cristal violeta al 10% (p/v) en etanol al 95% (v/v). (B) Oxalato amónico: 80 mL de oxalato amónico al 1% (p/v) en agua destilada.

Solución II. Preservar esta solución de la luz y desecharla al mes. Tomar 1 g de iodo y 2 g de ioduro potásico y enrasar hasta 300 mL con agua destilada.

Solución III. Solución de safranina: 10 mL de safranina al 2,5% (p/v) en etanol al 95% (v/v), mezclados con 100 mL de agua destilada.

Procedimiento

- Teñir 1 minuto con solución I.
- Aclarar con agua destilada durante algunos segundos.
- Aplicar la solución II 1 minuto.
- Escurrir el exceso de colorante y aclarar con agua destilada.
- Decolorar con etanol al 95% gota a gota durante 20-30 segundos.
- Lavar con agua destilada.
- Teñir con solución III durante 1 minuto.
- Lavar con agua destilada y secar por absorción con papel secante o filtro.
- Observar al microscopio con objetivo de inmersión (1000x) y en campo claro.

▪ Tinción de Neisser

Esta tinción pone de manifiesto la presencia de gránulos de reserva de polifosfato en el interior celular, mostrando en ese caso un color negro-azulado. El azul de metileno es catiónico y se une a los sitios aniónicos de las cadenas de polímeros de polifosfato. En el caso de que todo el tricoma presente la coloración azulada, se considera Neisser+. Si por el contrario el tricoma presenta color marrón claro y ausencia de gránulos, se considera Neisser-. Si el tricoma es Neisser- con presencia de gránulos, será gránulo Neisser+.

Reactivos

Solución I (A+B). Desechar al mes de ser preparada. Conservar A y B por separado. (A) Mezclar 0,2 g de azul de metileno con 10 mL de etanol al 95% (v/v), 10 mL de ácido acético glacial y 100 mL de agua destilada. (B) Mezclar 3,3 mL de cristal violeta al 10% (p/v) en etanol al 95% (v/v), con 6,7 mL de etanol al 95% y 100 mL de agua destilada.

Solución II. Tomar 33,3 mL de una solución de marrón de Bismark al 1% (p/v) en solución acuosa y enrasar hasta 100 mL con agua destilada.

Procedimiento

- Teñir el frotis con solución I durante 30 segundos.
- Lavar con agua destilada durante unos segundos.
- Teñir durante 1 minuto con solución II.
- Aclarar con agua destilada y secar por absorción con papel secante o filtro.
- Observar al microscopio con objetivo de inmersión (1000x) y en campo claro.

- Tinción de PHA (polihidroxialcanoatos)

Tinción de gránulos de PHA (gránulos lipídicos) en el interior de las bacterias. Los gránulos intracelulares negro-azulados se consideran PHA+, mientras que si los tricomas muestran un color rosa claro o sin teñir se consideran PHB-.

Reactivos

Solución I. Negro Sudán B (IV) al 0,33% (p/v) en etanol al 60%.

Solución II. Safranina al 0,5% (p/v) en solución acuosa.

Procedimiento

- Teñir el frotis con solución I durante 10 minutos. Si se evapora, añadir más colorante.
- Verter el exceso de colorante y lavar con agua destilada.
- Secar con papel secante o filtro.
- Teñir con solución II durante 15 segundos.
- Aclarar con agua destilada y secar con papel filtro o secante.
- Observar al microscopio con objetivo de inmersión (1000x).

- Tinción de azufre

Esta tinción pone de manifiesto la presencia del metabolismo del azufre, observándose gránulos muy brillantes de color amarillo cuando la respuesta es positiva.

Reactivos

Solución I. 1 g de tiosulfato sódico en 100 mL de agua destilada, siendo la caducidad del reactivo de 1 semana.

Procedimiento

- Tomar una muestra de fango activo y dejarla decantar.
- Transferir 20 mL del sobrenadante sin partículas en suspensión a un matraz.
- Añadir 1 mL de solución I.
- Someter a agitación durante una noche a temperatura ambiente.
- Observar a 1000x con contraste de fases y bajo aceite de inmersión.

- Tinción de vainas

Las células con ausencia de vainas se muestran intensamente teñidas de color violeta, mientras que las que posean vaina se observan de color claro o rosáceo.

Reactivos

Solución I. Cristal violeta al 0,1% (p/v) en solución acuosa.

Procedimiento

- Mezclar una gota de fango activo con una gota de solución I en un portaobjetos.
- Colocar un cubreobjetos encima, prensar y observar a 1000x bajo aceite de inmersión y en campo claro.

La densidad de organismos fue estimada según el criterio subjetivo propuesto por Eikelboom (2000), que establece el índice de filamentos (IF) dentro de una escala ordinal del 0-5 (tabla 3.4), utilizándose en algunas ocasiones valores intermedios de dicha escala. Para aquellas bacterias filamentosas que no pudieron englobarse en ninguno de los morfotipos propuestos por Eikelboom (2000, 2006) y Jenkins *et al.* (2004) se empleó un código numérico precedido de la abreviatura de la EDAR donde fueron identificadas. En la tabla 3.7 se indican las abreviaturas empleadas de los morfotipos identificados en el presente estudio

Tabla 3.5. Escala criterio subjetivo para la estimación de la densidad de microorganismos filamentosos.

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 fil/floc
4	Muy común	En todos los flóculos con una densidad 5-20 fil/floc
5	Abundante	En todos los flóculos con una densidad >20 fil/floc

Fuente: Eikelboom (2000)

Identificación mediante la técnica FISH

Para aplicar la técnica de hibridación *in situ* con sondas 16S/23S rDNA marcadas con fluoróforos (FISH) se debe adecuar previamente la muestra. Esto implica la fijación y permeabilización de la pared celular para inactivar las células microbianas y la actividad enzimática. La permeabilización de las células tiene como objetivo favorecer la penetración de la sonda (Nielsen *et al.*, 2009b). Una vez fijadas las células se aplica la técnica FISH, lo que permite realizar un análisis de la población bacteriana presente en la muestra tratada.

- Fijación celular

Para las bacterias Gram negativas se realiza la fijación con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 3 horas.

- Se toma 1 mL de muestra en un microtubo de 1,5 mL.
- Se centrifuga a 7000 rpm durante 3 minutos y se elimina el sobrenadante.
- Se añaden 250 µL de tampón fosfato salino (PBS) y 750 µL de PFA. Se mantiene a 4 °C durante 3 horas.
- Las células se centrifugan a 7000 rpm durante 3 minutos para eliminar el PFA.
- Las células se lavan con PBS 1X en centrífuga a 7000 rpm durante 3 minutos y se elimina el sobrenadante.

- Se repite el lavado para eliminar cualquier resto de PFA.
- Las células se vuelven a suspender en 500 μ L de PBS 1X y en 500 μ L de etanol absoluto frío (4 °C).
- Las células fijadas se guardan a -20 °C.

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

- Se toma 1 mL de muestra en un microtubo de 1,5 ml.
- Las células se centrifugan a 7000 rpm durante 3 minutos y se elimina el sobrenadante.
- Las células se vuelven a suspender en 500 μ L de PBS 1X y en 500 μ L de etanol absoluto frío (4 °C).
- Las células fijadas se guardan a -20 °C.

Para las bacterias del grupo Mycolata se realiza la fijación con PFA al 4% durante 1 minuto.

- Se toma 1 mL de muestra en un microtubo de 1,5 ml.
- Se centrifuga a 7000 rpm durante 3 minutos y se elimina el sobrenadante.
- Se añaden 250 μ L de tampón fosfato salino (PBS) y 750 μ L de PFA. Se mantiene a 4 °C durante 1 minuto.
- Las células se centrifugan a 7000 rpm durante 3 minutos para eliminar el PFA.
- Las células se lavan con PBS 1X en centrífuga a 7000 rpm durante 3 minutos y se elimina el sobrenadante.
- Se repite el lavado para eliminar cualquier resto de PFA.
- Las células se vuelven a suspender en 500 μ L de PBS 1X y en 500 μ L de etanol absoluto frío (4 °C).
- Las células fijadas se guardan a -20 °C.

Lavado del portaobjetos

El tratamiento de los portaobjetos con máscara de teflón tiene como objetivo el poder mantener sobre él mismo la mayor cantidad de células posibles y por más tiempo, evitando la pérdida de las células por los lavados previos y posteriores a la visualización en el microscopio. Como adhesivo celular se utiliza la gelatina. El tratamiento se lleva a cabo de la siguiente manera:

- Lavar con agua y detergente neutro.
- Enjuagar con agua destilada.
- Secar a temperatura ambiente (es importante secar completamente).
- Cubrir con gelatina por inmersión en solución al 0,1% con sulfato potásico cromato 0,01% (preparada en el momento, $T^{\circ}=60$ °C).
- Secar al aire (proteger del polvo ambiental).

Deshidratación seriada en soluciones de etanol. En primer lugar se procede a la aplicación de la muestra en los portaobjetos cubiertos de teflón, de la siguiente forma:

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

Permeabilización de células del grupo Mycolata

Al tratarse el género *Gordonia*, correspondiente al grupo de bacterias Gram positivas con ácidos micólicos, la permeabilización puede ser problemática en algunas ocasiones. Se utilizan protocolos alternativos con lipasa, lisozima, mutanolisina o HCl. Las células de *Gordonia* se han permeabilizado con un tratamiento enzimático con lisozima a 37 °C durante 30 minutos.

- Se pone un volumen de 4 μ L de muestra fijada al portaobjetos FISH.
- Se seca al aire o estufa.
- Se realiza tratamiento con lisozima.
- Se ponen 20 μ L de lisozima por pocillo 53 000/ml.
- Se incuba 30 minutos a temperatura ambiente y atmósfera húmeda en un tubo de Falcon de 50 mL con papel humedecido con 1mL de agua MilliQ.
- Se lava con agua MilliQ y se seca al aire.
- A continuación se realiza la deshidratación seriada en etanol al 50% durante 3 minutos (por inmersión).
- En etanol al 80% durante 3 minutos (por inmersión).
- En etanol absoluto durante 3 minutos (por inmersión).

Permeabilización de células *Microthrix*

- Poner un volumen de 4 μ L de muestra fijada en el portaobjetos FISH.
- Secar al aire.
- Deshidratar en etanol al 50% durante 3 minutos por inmersión.
- Deshidratar en etanol al 80% durante 3 minutos por inmersión.
- Deshidratar en etanol al 100% durante 3 minutos por inmersión.
- Secar al aire.
- Aplicar 10 μ L de mutanolisina (5000 U/mL) en cada pocillo y dejar actuar durante 20 minutos.
- Poner un trozo de papel celulosa dentro de un tubo Falcon con 1 mL de agua miliQ, para crear una atmósfera húmeda, e introducir cada porta en un tubo Falcon.
- Incubar a 37 °C durante 20 minutos.
- Limpiar los porta con agua MilliQ.
- Secar al aire.
- Deshidratar en etanol al 50% durante 3 minutos por inmersión.

- Deshidratar en etanol al 80% durante 3 minutos por inmersión.
- Deshidratar en etanol al 100% durante 3 minutos por inmersión.
- Secar al aire.

- Hibridación

Las reacciones de hibridación se realizan a concentraciones altas de NaCl y en presencia de agentes desnaturalizantes, como la formamida. El NaCl y el porcentaje de formamida son específicos para cada sonda.

Para ello, se prepara la solución de hibridación (microtubo de 2 mL) de la siguiente forma:

- Añadir 360 μ L de NaCl 5M.
- Añadir 40 μ L TrisHCl 1M.
- Añadir formamida según tabla 3.5.
- Añadir agua MilliQ según tabla 3.5.
- Añadir 2 μ L de sodio dodecil sulfato (SDS) al 10% y mezclar cuidadosamente.

Tabla 3.6. Cantidades de formamida y agua utilizadas para la preparación de la solución de hibridación.

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

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

- Introducir 9 μ L de la solución de hibridación en cada pocillo del portaobjeto que lleve muestra.
- Introducir 1 μ L de la sonda a utilizar y repartir homogéneamente por todo el pocillo.
- Introducir el portaobjetos con la solución de hibridación y la sonda a la cámara de hibridación (tubo tipo falcon de 50 mL previamente preparado con papel de celulosa dentro). Una vez dentro el portaobjetos a hibridar, el tubo se debe mantener siempre en posición horizontal.
- Incubar a 46 °C durante 2 horas. La hibridación de células del grupo Mycolata y *Microbrix* se incuba a 46 °C durante 3 horas.

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

- En un tubo tipo falcon de 50 mL añadir, según tabla 3.6, las cantidades indicadas de NaCl 5M dependiendo del porcentaje de formamida utilizada en la solución de hibridación.
- Añadir 1 mL de TrisHCl.
- Añadir EDTA según tabla 3.6.
- Aproximar a 50 mL con agua MilliQ.
- Añadir 50 μ L de SDS al 10% y mezclar cuidadosamente.

Tabla 3.7. Cantidades de NaCl para la solución de lavado.

% formamida de la sonda	NaCl (M)	NaCl 5M (μ L)	EDTA 0,5 M (μ L)
0	0,900	9000	-
5	0,636	6300	-
10	0,450	4500	-
15	0,318	3180	-
20	0,225	2150	500
25	0,159	1490	500
30	0,112	1020	500
35	0,080	700	500
40	0,056	460	500
45	0,040	300	500
50	0,028	180	500
55	0,020	99	500
60	0,014	41	500

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

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

En la tabla 3.7 se muestran las sondas moleculares utilizadas para la identificación de las bacterias filamentosas presentes en las muestras de fango activo. La selección de las distintas sondas se ha basado en las recomendaciones de Nielsen *et al.* (2009a), así como las descritas en los manuales de Nielsen *et al.* (2009b), Seviour & Nielsen (2010a) y Alonso *et al.* (2009). Junto a cada sonda se indica su secuencia 5´-3´ de oligonucleótidos y el porcentaje de formamida (FA) empleado en la hibridación, así como su referencia bibliográfica. Además, junto a cada sonda se indica su especificidad y el morfotipo convencional con el cual se le ha relacionado, lo cual facilita su posición actual. Por último, se indican las abreviaturas correspondientes a cada una de las sondas empleadas, que han sido utilizadas tanto en el análisis estadístico como en los apartados de resultados y discusión.

Tabla 3.8. Sondas de oligonucleótidos y morfotipos utilizados en la identificación de bacterias filamentosas.

Morfotipo	Sonda	Secuencia (5'-3')	%FA	Especificidad	Abreviatura	Referencia
<i>Thiothrix</i> y 021N	G123T	CCTTCGGATCTCTATGCA	40	<i>Thiothrix</i> sp.	G123T	Kanagawa <i>et al.</i> (2000)
<i>Thiothrix</i> y 021N	cG123T	CCTTCGGATCTCTACGCA	40	Competidora G123T	-	Kanagawa <i>et al.</i> (2000)
Tipo 021N	-	-	-	-	T021N	Eikelboom (2000)
Tipo 021N	G1B	TGTGTTCGAGTTCCTTGC	30	<i>T. disciformis</i> (grupo I)	Tdisci	Kanagawa <i>et al.</i> (2000)
Tipo 021N	G2M	GCACCACCGACCCCTTAG	35	<i>T. eikelboomii</i> (grupo II)	Teikelb	Kanagawa <i>et al.</i> (2000)
Tipo 021N	G3M	CTCAGGGATCTCTGCCAT	30	<i>T. flexilis</i> (grupo III)	Tflexi	Kanagawa <i>et al.</i> (2000)
<i>Thiothrix</i> (I, II)	-	-	-	-	-	Eikelboom (2000)
<i>Thiothrix</i>	TNI	CTCCTCTCCCACATTCTA	45	<i>T. nivea</i> , <i>T. unzii</i>	Tniv	Wagner <i>et al.</i> (1994)
<i>Thiothrix</i>	TFR	CTCCTCTCCCACACTCTA	35	<i>T. fructosivorans</i> , ' <i>T. ramosa</i> '	Tfruct	Kim <i>et al.</i> (2002)
<i>Thiothrix</i>	cTNI y TFR	TCCCTCTCCCACATTCTA	45/35	Competidora TNI y TFR	-	Kim <i>et al.</i> (2002)
<i>Nostocoida limicola</i> I	-	-	-	-	NlimI	Eikelboom (2000)
<i>Nostocoida limicola</i> I	NlimI91	CGCCACTATCTTCTCAGT	20	<i>Trichococcus</i> sp.	Trichoc	Liu & Seviour (2001)
<i>Nostocoida limicola</i> II y III	-	-	-	-	NlimIII	Eikelboom (2000)
<i>Nostocoida limicola</i> II	Noli-644	TCCGGTCTCCAGCCACA	35	<i>Ca. 'Alysiosphaera europaea'</i>	Aeurop	Levantesi <i>et al.</i> (2004)
<i>Nostocoida limicola</i> II	MC2-649	CTCTCCCGGACTCGAGCC	35	<i>Ca. 'Monilibacter batavus'</i>	Mbatav	Levantesi <i>et al.</i> (2004)
<i>Nostocoida limicola</i> II	AHW183	CCGACTACTCCACTCGT	35	<i>Nostocoida limicola</i>	NlimII-chl	Schade <i>et al.</i> (2002)
<i>Nostocoida limicola</i> II	Nlim192	AGACTTTCCAGACAGGAG	20	<i>Tetrasphaera japonica</i>	Tjapon	Liu & Seviour (2001)
<i>Nostocoida limicola</i> III	NlimIII301	CCCAGTGTGCGGGCCAC	20	<i>Isosphaera</i> sp.	Isosph	Liu & Seviour (2001)
<i>Nostocoida limicola</i> III	NlimIII729	AGCATCCAGAACCTCGCT	20	<i>Isosphaera</i> sp.	Isosph	Liu & Seviour (2001)
<i>Nostocoida limicola</i> III	NlimIII830	CCATCGGCGAGCCCCCTA	20	<i>Isosphaera</i> sp.	isosph	Liu & Seviour (2001)
Tipo 0803/0914	-	-	-	-	T0803	Eikelboom (2000)
Tipo 0803	Caldi-0678	TTCCACCACTACACCGGG	30	Género <i>Caldilinea</i>	T0803-cal	Kragelund <i>et al.</i> (2011)
Tipo 0803	Comp1-caldi	TTTCCACCACTACACCGGG	-	Competidora 1	-	Kragelund <i>et al.</i> (2011)
Tipo 0803	Comp2-caldi	TTCCACCGCTACACCGGG	-	Competidora 2	-	Kragelund <i>et al.</i> (2011)
Tipo 0803	T0803-0654	ACACC CTCTCACYRCCT	30	Tipo 0803	T0803-D	Kragelund <i>et al.</i> (2011)
Tipo 0803	T0803ind-0642	CTGCCTCAAGTACTCAG	30	Tipo 0803	T0803-I	Kragelund <i>et al.</i> (2011)
Tipo 0803	h1 T0803ind-0607	AGTTAAGCCAGGAGATTT	-	Helper	-	Kragelund <i>et al.</i> (2011)
Tipo 0803	h2 T0803ind-0625	TTTCCAACGACCCCTCCC	-	Helper	-	Kragelund <i>et al.</i> (2011)
Tipo 0803	h3 T0803ind-0662	GAATTCTACACCCCTCTC	-	Helper	-	Kragelund <i>et al.</i> (2011)
Tipo 0803	h4 T0803-0680	ATTCCACCACTACACCGG	-	Helper	-	Kragelund <i>et al.</i> (2011)
Tipo 0914	CFX67a	TTCCGAAGATCAGGTTCG	-	Tipo 0914	T0914-a	Speirs <i>et al.</i> (2009)
Tipo 0914	CFX67-H46	TTCGACTTGCATGTGTTARGC	-	Helper	-	Speirs <i>et al.</i> (2009)
Tipo 0914	CFX67 comp.	TTCCGAAGATCAGGTTCG	-	Sonda competidora	-	Speirs <i>et al.</i> (2009)
Tipo 0914	CFX67b	TTCCGAAGATTAGGTTCG	35	Tipo 0914	T0914-b	Speirs <i>et al.</i> (2009)
Tipo 0914	CFX67-H95	CCGTRCGCCACTAACCCYT	-	Sonda helper	-	Speirs <i>et al.</i> (2009)
Tipo 0092	-	-	-	-	T0092	Eikelboom (2000)
Tipo 0092	CFX197	TCCCGGAGCGCCTGAACT	40	Variante A	T0092-A	Speirs <i>et al.</i> (2010)
Tipo 0092	CFX197comp	TCCCGAAGCGCCTGAACT	-	Sonda competidora	-	Speirs <i>et al.</i> (2010)
Tipo 0092	CFX223	GGTGCTGGCTCTCCAG	35	Variante B	T0092-B	Speirs <i>et al.</i> (2010)
Tipo 0092	CFX223 H202	AGCGCTGAGCTTCAGTCATC	-	Helper	-	Speirs <i>et al.</i> (2010)
Tipo 0092	CFX223 H241	CGTTACCTTACCAACTAGCTGATG-	-	Helper	-	Speirs <i>et al.</i> (2010)
<i>Microthrix parvicella</i>	-	-	-	-	Mparv	Eikelboom (2000)
<i>Microthrix parvicella</i>	MPA645	CCGGACTCTAGTCAGAGC	20	<i>M. parvicella</i>	MPA645	Erhart <i>et al.</i> (1997)
<i>Microthrix parvicella</i>	MPA60	GGATGGCCGCTTCGACT	20	<i>M. parvicella</i>	MPA60	Erhart <i>et al.</i> (1997)
<i>Microthrix parvicella</i>	MPAail-1410	GGTGTGTGCTGACTTTCGGCG	35	<i>Microthrix</i>	MPA1410	Levantesi <i>et al.</i> (2006)
<i>Microthrix parvicella</i>	MPA-T1-1260	TTCGCATGACCTCACGGTTT	20	<i>M. calida</i>	Mcalid	Levantesi <i>et al.</i> (2006)
GALO	-	-	-	-	GALO	Eikelboom (2000)
GALO	Gor0596	TGCAGAAATTCACAGACGACGC	20	<i>Gordonia</i> sp.	Gord	de los Reyes <i>et al.</i> (1997)
PTLO	Spin1449	CCGCTCCCTCCCAAAAG	35	<i>Skermania piniformis</i>	Sker	Eales <i>et al.</i> (2006)
<i>H. hydrossis</i>	-	-	-	-	Hhydr	Eikelboom (2000)
<i>H. hydrossis</i>	HHY	GCC TAC CTC AAC CTG ATT	20-25	<i>Halicomenobacter hydrossis</i>	HHY	Wagner <i>et al.</i> (1994a, b)
Tipo 1701	-	-	-	-	T1701	Eikelboom (2000)
Tipo 1863	-	-	-	-	T1863	Eikelboom (2000)
<i>Beggiatoa</i> sp.	-	-	-	-	Begg	Eikelboom (2000)
Tipo 0411	-	-	-	-	T0411	Eikelboom (2000)
Tipo 1851	-	-	-	-	T1851	Eikelboom (2000)
Tipo 0581	-	-	-	-	T0581	Eikelboom (2000)
Tipo 0041	-	-	-	-	T0041	Eikelboom (2000)

3.5 Análisis de los datos

La estrategia general seguida para el tratamiento de los datos ha sido en primer lugar el análisis descriptivo y tratamiento preliminar de ambos conjuntos de variables: ambientales (variables fisicoquímicas y operacionales) y biológicas (protistas, metazoos y bacterias filamentosas). Posteriormente, se realizó un análisis exploratorio de ambos conjuntos de variables, empleando rutinas multivariantes con un enfoque no paramétrico y basadas en matrices distancia. Por último, el análisis de interpretación ambiental ha permitido relacionar ambos conjuntos de variables a partir de modelos lineales basados en la distancia (DISTLM) y técnicas de ordenación basadas en análisis propios, como es el análisis de correspondencias canónico (CCA).

Análisis descriptivo y tratamiento preliminar de los datos

En primer lugar fueron exploradas las siguientes opciones para la transformación de las variables biológicas, y de esta forma ponderar lo suficiente el efecto de los microorganismos muy abundantes respecto a los poco abundantes:

1. Ninguna transformación.
2. Raíz cuadrada.
3. Raíz cuarta.
4. Log (X+1).
5. Transformación binaria (presencia/ausencia).

La elección de la transformación se realizó a partir del cálculo de los coeficientes de correlación de Spearman entre las matrices distancia de Bray-Curtis correspondiente a las cinco opciones (rutina 2STAGE, *Second-stage analysis*), contrastando las distintas opciones a partir de la representación visual del gráfico de trazado sombreado (*shade plot*) y escalamiento multidimensional no métrico (nMDS). Además, se ha utilizado la rutina BIO-ENV, relacionando la matriz biológica y la matriz de variables ambientales, con el objetivo de examinar aquellas transformaciones que maximizan la correlación en la rutina, según sugieren Clarke *et al.* (2014). En base a dichas herramientas, se seleccionó la transformación Log (X+1) para los valores de densidad absoluta de protistas y metazoos, mientras que para la escala ordinal de estimación de la abundancia de microorganismos filamentosos se utilizó la transformación raíz cuadrada.

La prueba de Kolmogorov-Smirnov se utilizó para contrastar la hipótesis de normalidad de las variables ambientales. Por otro lado, la simetría de los datos fue explorada a partir de los histogramas de frecuencia y gráfico de dispersión múltiple de puntos (*draftsman plot*). Las variables ambientales han sido transformadas con la función Log (X+1) y

posteriormente normalizadas (rutina estandarización) para la homogenización de las variables con diferentes escalas de medida.

Todas las rutinas utilizadas correspondientes al análisis descriptivo y tratamiento preliminar de los datos han sido realizadas con PRIMER v7 (Clarke & Gorley, 2015), a excepción de la prueba de Kolmogorov-Smirnov, la cual se realizó con el programa IBM SPSS 21 (Chicago, IL, USA).

Previamente a los análisis exploratorios y de interpretación ambiental fueron construidas las matrices de similitud (matrices distancia) de las variables biológicas transformadas, utilizando el índice de Bray-Curtis (Bray & Curtis, 1957), así como las correspondientes a las variables ambientales transformadas y estandarizadas, utilizando la distancia euclídea.

Análisis exploratorio

El escalamiento multidimensional no métrico (nMDS) y el análisis de coordenadas principales (PCoA) fueron empleados para identificar los patrones de distribución de las variables biológicas y ambientales, según los siguientes factores: biorreactor y estacional. Además, el análisis clúster se superpuso en el nMDS con el objetivo de visualizar mejor el agrupamiento de las muestras, empleando el método de promedio no ponderado de pares de grupos (Field *et al.*, 1982). Por otro lado, el análisis de las diferencias significativas entre grupos (factores estudiados), a partir de ambos tipos de variables, fue explorado utilizando el análisis de similitudes de una vía y cruzado de dos vías (ANOSIM) y el análisis multivariante de la varianza permutacional (PERMANOVA). El análisis de porcentajes de similitudes (SIMPER) se aplicó con el objetivo de determinar las variables biológicas que más contribuyeron a la similitud y disimilitud entre los biorreactores. La prueba de no paramétrica de Kruskal-Wallis fue aplicada para el análisis de las diferencias significativas ($p < 0,05$) de cada una de las variables ambientales, según el factor biorreactor y estacional. Posteriormente, para extraer nuevos ejes de variación que resuman la relación entre las variables ambientales, fue aplicado el análisis de componentes principales (PCA).

Todas las rutinas utilizadas correspondientes al análisis exploratorio han sido realizadas con PRIMER v7 (Clarke & Gorley, 2015) y PERMANOVA+ para PRIMER (Anderson *et al.*, 2008), a excepción de la prueba de Kruskal-Wallis, la cual se realizó con el programa STATISTICA 10.0 (StatSoft, 2011).

Análisis de interpretación ambiental

El análisis canónico de coordenadas principales (CAP) fue utilizado para determinar las variables biológicas y ambientales más correlacionadas con los distintos biorreactores y estaciones.

El análisis de correlación no paramétrico entre matrices biológicas y ambientales (rutina BIO-ENV) fue aplicado por un lado para encontrar las combinaciones de variables relacionadas con la eliminación del nitrógeno que mejor explican la dinámica poblacional de protistas y metazoos, y por otro lado, para estudiar la inercia biológica de las variables operacionales. Previa a la aplicación de la rutina BIO-ENV para la exploración de las relaciones entre las variables del nitrógeno y las variables biológicas, se utilizó el gráfico múltiple de dispersión de puntos (*draftsman plots*) y la matriz de correlación de Pearson entre pares de variables ambientales con el fin de examinar la colinealidad, eliminando aquellas variables que presentaron coeficientes de correlación mayores de 0,95 (Clarke *et al.*, 2014). La selección de la mejor combinación de variables ambientales a partir de la rutina BVSTEP (similar a BIO-ENV pero en este caso utiliza el algoritmo *stepwise*) fue utilizada para explorar el efecto de la ordenación de las variables ambientales en función de su tipología, así como el efecto de combinar todas las matrices ambientales de los diferentes biorreactores (matriz total), empleando el método de correlación de rangos de Spearman y el criterio $\rho > 0,95$ y $\Delta \rho < 0,001$. En este caso, la colinealidad fue examinada de la misma forma que para la rutina BIO-ENV, eliminando aquellas variables que presentaron coeficientes de correlación mayores de 0,95. El test secuencial, generado en la construcción de cada uno de los modelos lineales basados en la distancia (rutina DISTLM) de los biorreactores y matriz total, ha sido utilizado para comparar los resultados obtenidos a partir de la rutina BVSTEP.

Para la búsqueda de organismos bioindicadores del proceso de fangos activos, así como de aquellas variables ambientales que mejor explicaron la dinámica poblacional de protistas, metazoos y bacterias filamentosas, se aplicó un doble enfoque: lineal (DISTLM) y unimodal (CCA).

Con el objetivo de evaluar la contribución de las variables ambientales en la variabilidad observada de las poblaciones de microorganismos de las muestras estudiadas de fangos activos, fueron construidos modelos lineales basados en la distancia (DISTLM). Previamente a la aplicación de la rutina DISTLM, se utilizó el gráfico múltiple de dispersión de puntos (*draftsman plots*) y la matriz de correlación de Pearson entre pares de variables ambientales con el fin de examinar la colinealidad, eliminando aquellas variables que presentaron coeficientes de correlación mayores de 0,85 (Anderson *et al.*, 2008). Las variables ambientales se analizaron individualmente (test marginal), ignorando el resto de variables, y secuencialmente (test secuencial) a partir de los procedimientos *forward selection* y *stepwise* y los criterios *adjusted R²*, *AIC_C* (*Akaike Information Criterion corrected*) y *BIC* (*Bayesian Information Criterion*), usando 999 permutaciones. El criterio *AIC_C* fue utilizado alternativamente al *AIC*, debido a que el número de unidades experimentales o muestras (*N*) fue menor respecto al número de variables explicativas (*v*), teniendo en cuenta que la relación *N/v*

fue inferior a 40 (Anderson *et al.*, 2008). Siempre que fue posible se utilizaron procedimientos y criterios que permitieran construir modelos parsimoniosos, es decir, modelos simples con un número muy reducido de variables ambientales y elevada capacidad de predicción. Todos los modelos resultantes se han visualizado utilizando el análisis de redundancia basado en la distancia (db-RDA), superponiendo los vectores correspondientes a los coeficientes de correlación de Pearson de las variables biológicas, así como el gráfico de burbujas (*bubble plots*), que representa los valores de las variables ambientales.

Previamente a la construcción de los modelos de ordenación basados en el análisis de correspondencias canónico (CCA), se valoró la conveniencia de utilizar el modelo unimodal. Para ello se aplicó el análisis de correspondencias corregido (DCA, *detrended correspondence analysis*), el cual estima la longitud del gradiente en unidades de desviación estándar (SD). La teoría del análisis del gradiente, propuesta por ter Braak & Prentice (1988), establece el rango de 1,5-3 SD en el cual todavía pueden ser usados indistintamente el RDA y el CCA. Por tanto, debido a que uno de los objetivos planteados en el presente estudio es la estimación de los valores óptimos ambientales, se construyeron modelos unimodales (CCA) siempre que la longitud del gradiente fue superior a 1,5 SD. El factor de inflación de la varianza (VIF) se utilizó como medida de colinealidad entre variables (medida del nivel de redundancia), excluyendo del modelo aquellas variables con valores del VIF superiores a 20, según sugieren ter Braak & Šmilauer (2002). El nivel de significación de las variables restantes ha sido calculado de forma manual con la rutina *forward selection*, empleando el test de Montecarlo con 999 permutaciones, excluyendo de los modelos aquellas variables con un nivel de significación mayor de 0,05. Por último, la ordenación parcial del CCA (pCCA) ha sido aplicada para calcular la variabilidad biológica explicada por cada una de las variables ambientales, eliminando los posibles efectos debidos a otras variables ambientales (ter Braak, 1988).

La construcción de los modelos lineales basados en la distancia (DISTLM-dBRDA) han sido realizados utilizando PRIMER v7 (Clarke & Gorley, 2015) y PERMANOVA+ para PRIMER (Anderson *et al.*, 2008), mientras que para el análisis de correspondencias canónico se utilizó el programa CANOCO 4.5 para Windows (ter Braak & Šmilauer, 2002).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Dinámica poblacional de protistas y metazoos en respuesta al factor biorreactor-estacional

En nuestro estudio, realizado en seis biorreactores, se han identificado un total de 57 especies de protistas (51) y metazoos (6), como se muestra en la tabla 1 del anexo. Se ha calculado para cada una de las especies identificadas el promedio, desviación estándar y el rango de aparición (mínimo-máximo) en términos de abundancia absoluta (ind/mL) en cada uno de los biorreactores.

Para la caracterización de la estructura de la comunidad se realizó una estimación de la frecuencia de aparición en las muestras de todas las especies de protistas y metazoos, eliminándose aquellas con una frecuencia muy baja, inferior al 20%. De esta forma, la comunidad se encuentra representada principalmente por especies de ciliados (en verde), amebas (en naranja), flagelados (en rojo) y los pequeños metazoos (en azul) (figura 4.1).

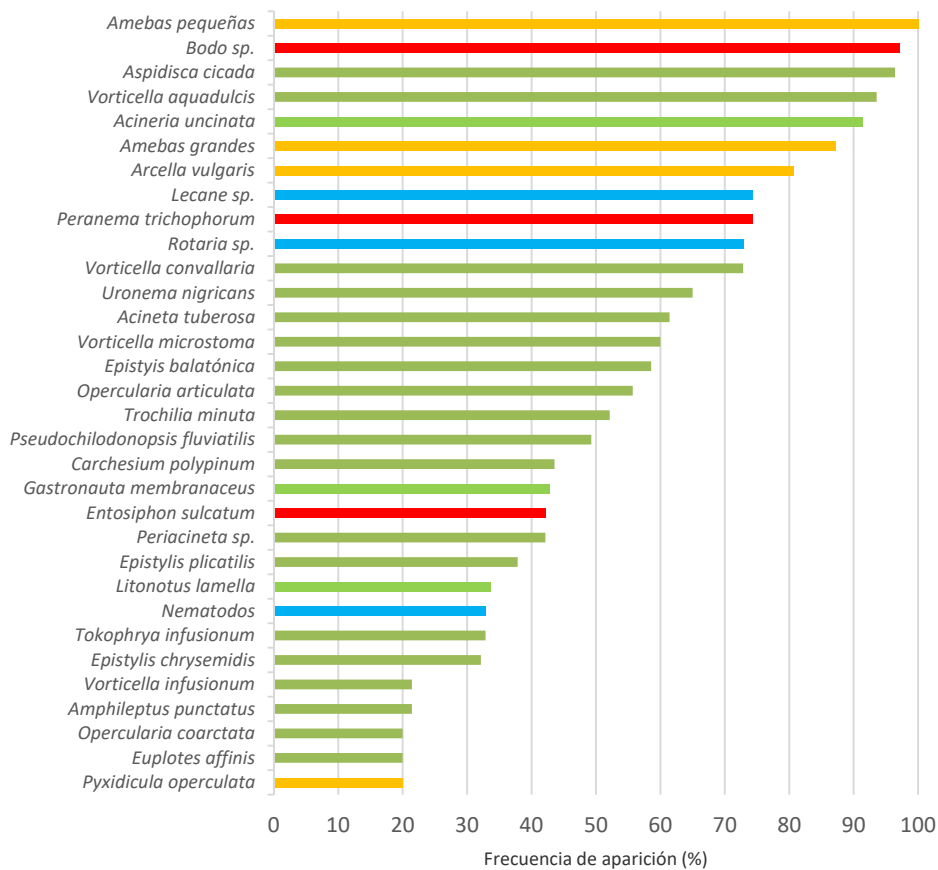


Figura 4.1. Diagrama de la frecuencia de aparición de las especies de protistas y metazoos (>20%). Ciliados (verde), amebas (naranja), flagelados (rojo) y metazoos (azul).

Según los resultados, los organismos que aparecen con mayor frecuencia (>80%) son los siguientes: amebas desnudas y *Arcella vulgaris*, pequeños flagelados del género *Bodo* sp., y ciliados reptantes y sésiles como *Aspidisca cicada*, *Acineria uncinata* y *Vorticella aquadulcis* (figura 4.2). Además, estas especies también presentan las frecuencias absolutas más elevadas, destacando los bodónidos, aunque estos presentan una desviación estándar muy elevada.

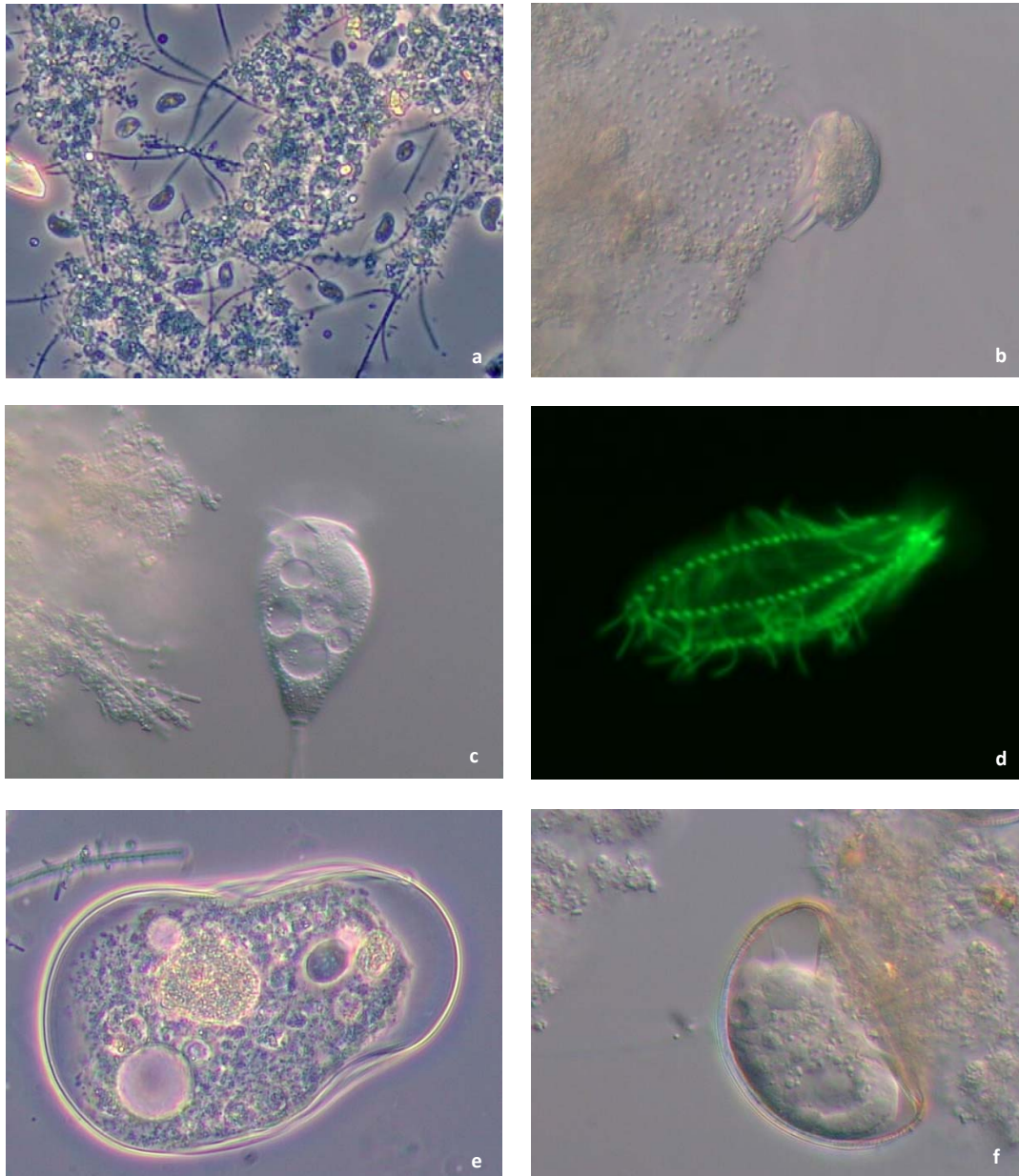


Figura 4.2. Protistas más frecuentes. (a) *Bodo saltans*. Contraste de fases, 400x. (b) *Aspidisca cicada*. Contraste interferencial de Nomarski, 400x. (c) *Vorticella aquadulcis*. Contraste interferencial de Nomarski, 400x. (d) *Acineria uncinata*. Tinción de Flutax, 400x. (e) Ameba desnuda >50 µm. Contraste de fases, 400x. (f) *Arcella vulgaris*. Contraste interferencial de Nomarski, 400x.

En la figura 4.3 se muestra el *ranking* de ciliados según el promedio de abundancia absoluta, ocupando los primeros puestos las siguientes especies: *Aspidisca cicada* (4.2b), *Acineria uncinata* (4.2d), *Vorticella aquadulcis* (4.2c), *Epistylis balatonica* (figura 4.4a) y *Trochilia minuta* (figura 4.4b). Si se consideran los organismos con menores valores de densidad absoluta, como son *Periacineta* sp., *Tokophrya infusionum* y *Litonotus lamella*, presentan una moderada frecuencia de aparición (42, 33 y 34%, respectivamente). En cambio, en los casos de *Amphileptus punctatus*, *Epistylis chrysemidis*, *Opercularia coarctata* y *Euplotes affinis*, a pesar de mostrar frecuencias por debajo del 30%, pueden presentar valores máximos de abundancia absoluta entre 1180 y 2720 ind/mL en casos particulares (tabla 8.2 del anexo).

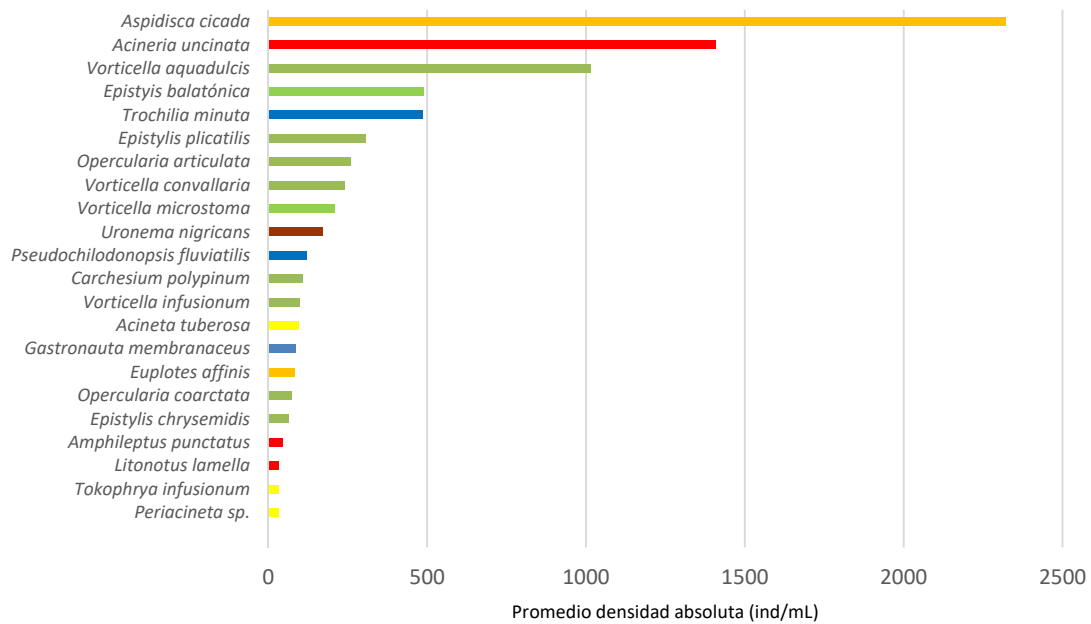


Figura 4.3. *Ranking* del promedio de abundancia absoluta (ind/mL) de ciliados. Hipotricos (naranja), haptróridos (rojo), peritricos (verde), filofariengeos (azul), suctores (amarillo), escuticociliados (marrón).

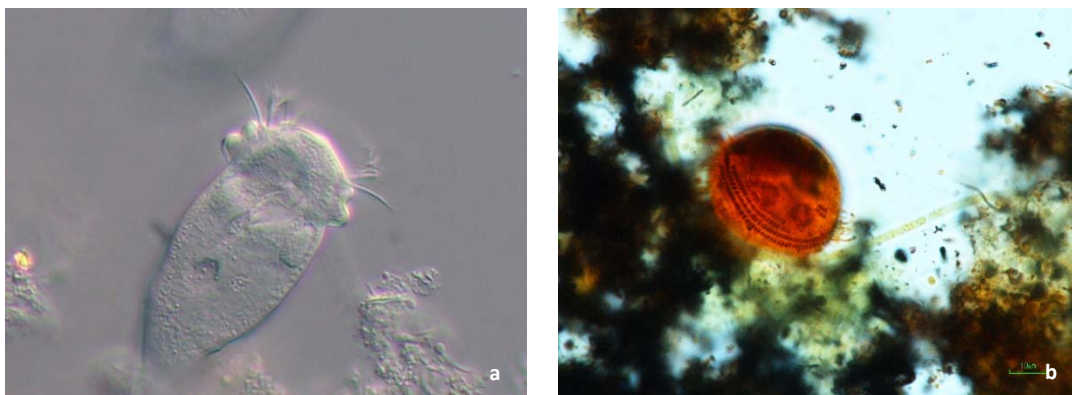


Figura 4.4. Ciliados dominantes. (a) *Epistylis balatonica*. Microscopía de interferencia diferencial de Nomarski, 400x. (b) *Trochilia minuta*. Tinción de plata, campo claro, 400x.

Los ciliados representan el grupo con un mayor número de especies en los tres biorreactores (tablas 8.1 y 8.2 del anexo). En las figuras 4.5 y 4.6 se representan los porcentajes de los distintos grupos taxonómicos de ciliados, considerando los resultados globales obtenidos. En general, los heterotricos, peniculinos, esticotricos y los prorodóntidos se encuentran escasamente representados en todos los biorreactores, siempre por debajo del 20% de aparición que se ha establecido como límite para los análisis estadísticos. En los tres biorreactores, los grupos dominantes de ciliados son los hipotricos, peritricos y haptóridos. En los reactores biológicos CT1 y CT2, que operan en paralelo en la EDAR de Castellón, se aprecian diferencias en la densidad de hipotricos, siendo mayor la proporción en CT1 que en CT2. Contrariamente, la proporción de peritricos y haptóridos es mayor en CT2 que en CT1 (figura 4.5). En el caso de la EDAR Quart-Benàger (QB), presentan porcentajes más similares a los de CT2.

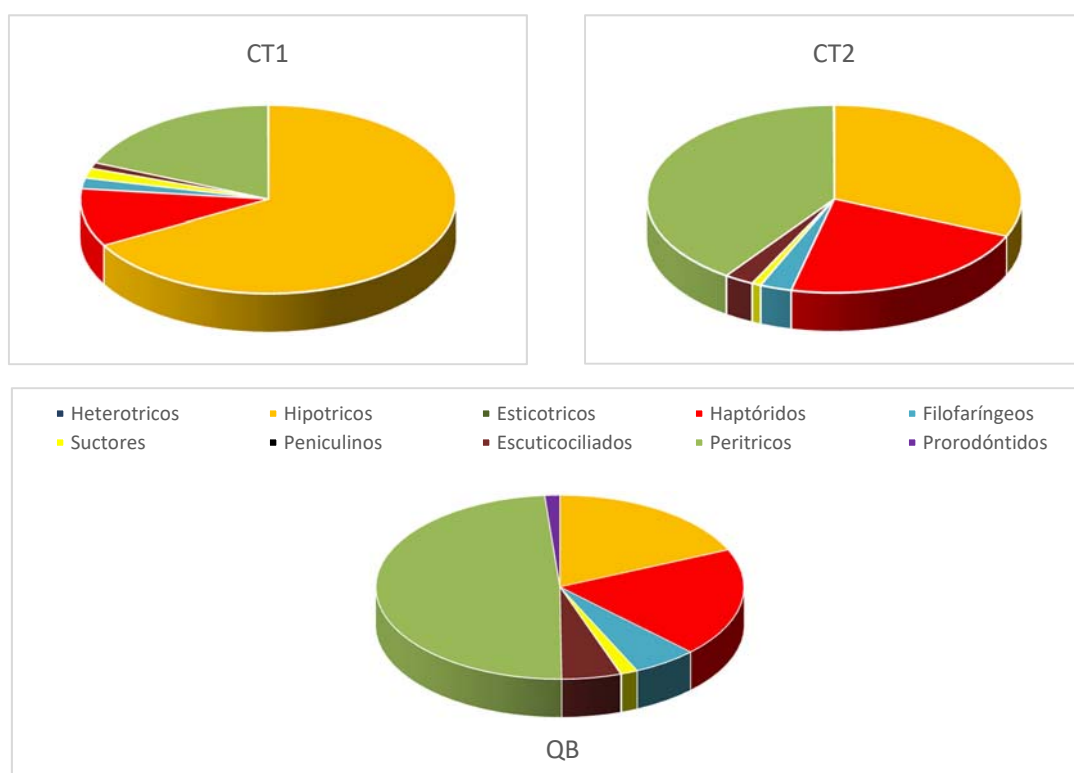


Figura 4.5. Porcentaje del promedio de abundancia absoluta de grupos taxonómicos de ciliados en los biorreactores QB, CT1 y CT2.

Contrariamente a lo observado en CT, en la EDAR del Carraixet (CX) no se aprecian diferencias significativas entre ambos biorreactores (CXAB y CXCD) (figura 4.6). En este caso siguen dominando los grupos de peritricos e hipotricos, si bien los haptóridos y suctores adquieren importancia en la comunidad, que es más semejante a los

birreactores QB y CT2. En el caso del biorreactor de la EDAR de Denia-Ondara-Pedreguer (DN), hay que destacar la predominancia de filofaríngeos sobre peritricos, hipotricos y haptóridos.

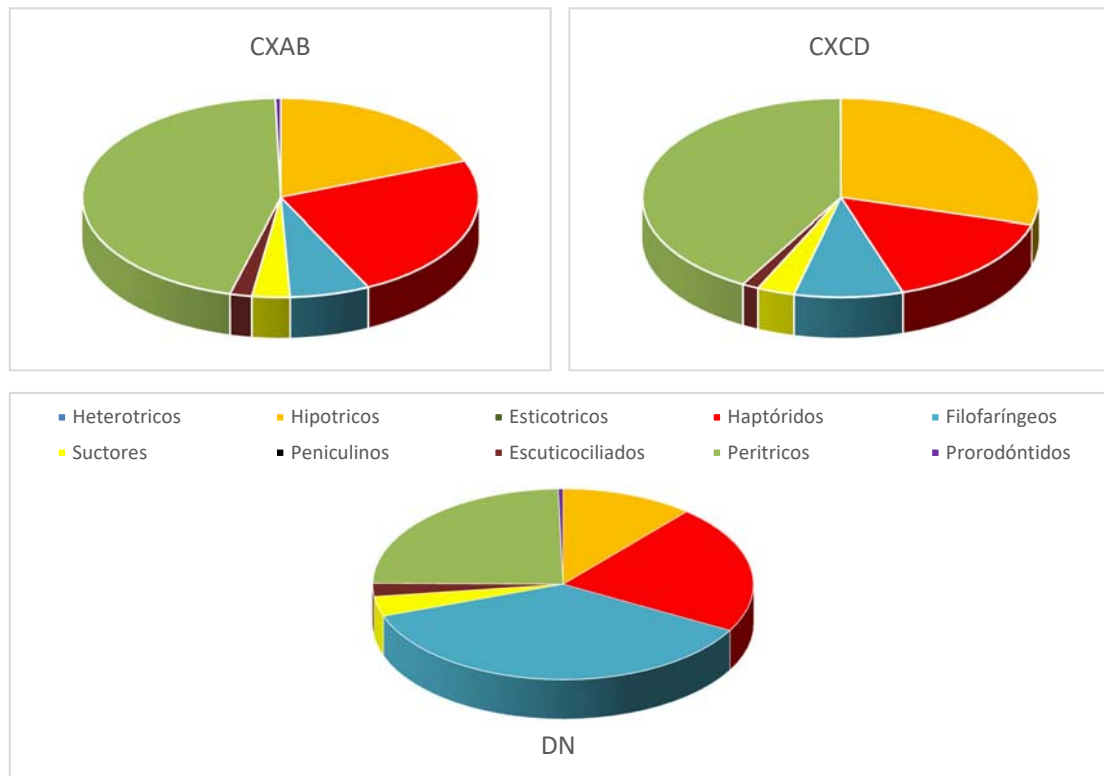


Figura 4.6. Porcentaje del promedio de abundancia absoluta de los grupos taxonómicos de ciliados en los biorreactores CXAB, CXCD y DN.

A continuación se aplicaron diversas técnicas estadísticas para la exploración del conjunto de variables biológicas, correspondientes a especies y géneros de protistas y metazoos, así como sus grupos (indicados en las tablas 1 y 2 del anexo).

En primer lugar se realizó un análisis para determinar las diferencias entre los biorreactores en el espacio multidimensional no métrico (nMDS), en función de la densidad absoluta de las variables biológicas (figura 4.7). El nivel de *stress* elevado observado ($>0,20$) reduce la dimensionalidad de la ordenación, por ello y con el fin de obtener una representación más clara de las agrupaciones en los biorreactores, se ha superpuesto el análisis clúster con un nivel de similitud de 60 según la distancia de Bray-Curtis. La figura del nMDS muestra un patrón de distribución en el cual el biorreactor CT1 se separa del resto, especialmente de CT2 (reactor que opera en paralelo con CT1). La agrupación clúster ha revelado cuatro grupos: un grupo compuesto por muestras procedentes de CT1, otro con

muestras de CX, otro con CT1 y CT2, y el último que agrupa la mitad de muestras aproximadamente de CX y DN, así como el total de las procedentes de QB y CT2.

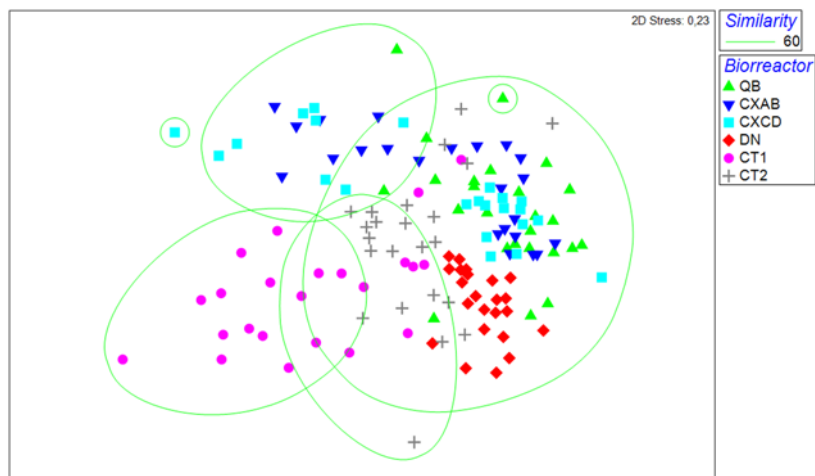


Figura 4.7. Análisis clúster y nMDS a partir de la densidad de protistas y metazoos, según el factor biorreactor.

Las variables biológicas que más han contribuido a la separación de las muestras de los biorreactores CT1 y CT2 han sido también representadas en el espacio multidimensional no métrico, en este caso utilizando vectores de correlación de Pearson ($r > 0,6$) (figura 4.8). La longitud y la dirección de los vectores representan la fuerza y la dirección de la relación, siendo *O. articulata*, *A. uncinata* y *A. vulgaris* los protistas más relacionados con CT2.

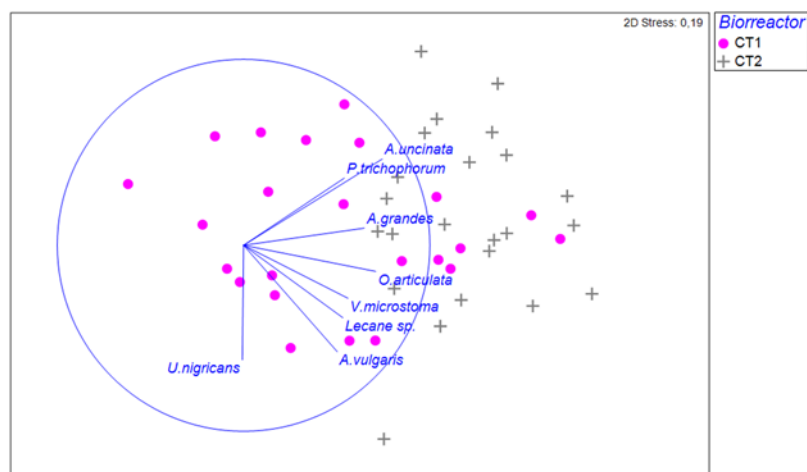


Figura 4.8. nMDS a partir de la densidad de protistas y metazoos, según el factor biorreactor en CT. Los vectores superpuestos representan los vectores de correlación de Pearson ($r > 0,6$) de las variables biológicas.

La figura 4.9 representa el nMDS de la distribución del total de muestras en función de la densidad de los diferentes grupos de protistas y metazoos en las muestras, según el factor biorreactor. La figura presenta en general un patrón de distribución superpuesto, donde el biorreactor CT1 queda separado ligeramente del resto, especialmente de DN y QB.

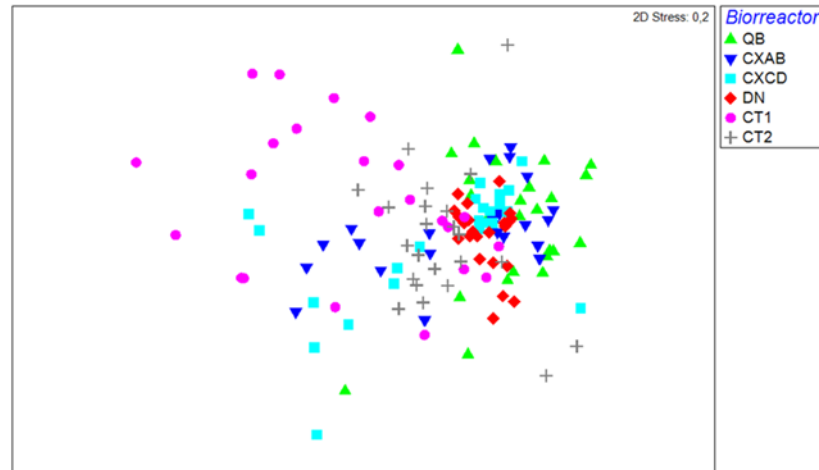


Figura 4.9. nMDS a partir de la densidad de los grupos de protistas y metazoos, según el factor biorreactor.

El análisis de similitud cruzado (ANOSIM cruzado) representado en la tabla 4.1 muestra las diferencias entre los distintos biorreactores a lo largo de las estaciones del año, a partir de las abundancias absolutas de protistas y metazoos, y sus grupos. Los resultados sobre la existencia de diferencias significativas entre los biorreactores y en función de las estaciones coinciden con el patrón encontrado en el nMDS, en el caso de protistas y metazoos (figura 4.7). El valor 0,48 del estadístico global R indica que existe una separación entre biorreactores, aunque con una ligera superposición. Los estadísticos R parciales también indican resultados similares a los obtenidos con el nMDS, siendo CT1-QB los biorreactores que presentan mayor separación ($R=0,80$). Por otro lado, los biorreactores de la EDAR CX no muestran una separación significativa, indicando que sus respectivas comunidades biológicas fueron muy similares a lo largo del tiempo. En el caso de los biorreactores de la EDAR CT se observa una ligera separación ($R=0,32$), aspecto relevante puesto que se trata de biorreactores que operan en paralelo. En el caso de los grupos, las diferencias entre biorreactores a lo largo de las estaciones revela un valor bajo del estadístico R global, indicando que existen pequeñas diferencias entre los biorreactores. No obstante, los estadísticos R parciales indican una separación significativa entre QB-CT1, DN-CT1 y CXAB-CT1, resultados que estarían de acuerdo con los encontrados en el nMDS (figura 4.9).

La rutina ANOSIM y el análisis multivariante permutacional de la varianza (PERMANOVA) de 1 vía han permitido explorar las distancias debidas solo al factor estacional, así como las diferencias significativas entre los diferentes biorreactores, respectivamente. Los resultados del ANOSIM han revelado pequeñas diferencias estacionales en la densidad de los protistas y metazoos (R global de 0,13, nivel de significación del 0,1%). En invierno-primavera y primavera-verano no se observan prácticamente diferencias (R=0,056 y R=0,052), observándose en el caso de primavera-otoño y otoño-invierno. Por otro lado, los resultados de la rutina PERMANOVA (df=3; SS=10865; MS=3621,6; Pseudo-F=5,02 y p[perm]=0,001) indican que existen diferencias significativas entre todos los pares de estaciones en relación con la densidad de protistas y metazoos, mientras que otoño-verano y primavera-invierno no muestran diferencias significativas ($p > 0,05$) si se consideran los grupos.

Tabla 4.1. ANOSIM cruzado de 2 vías a partir de las abundancias absolutas de las variables biológicas, según el factor biorreactor-estacional.

	Protistas y metazoos		Grupos	
	R	Significancia (%)	R	Significancia (%)
BIORREACTOR	0,479	0,2	0,310	0,1
QB, CXAB	0,308	0,1	0,184	0,6
QB, CXCD	0,356	0,1	0,240	0,1
QB, DN	0,593	0,1	0,217	0,1
QB, CT1	0,803	0,1	0,643	0,1
QB, CT2	0,536	0,1	0,348	0,1
CXAB, CXCD	-0,078	95,4	-0,057	87,2
CXAB, DN	0,628	0,1	0,358	0,1
CXAB, CT1	0,614	0,1	0,576	0,1
CXAB, CT2	0,450	0,1	0,260	0,1
CXCD, DN	0,638	0,1	0,342	0,1
CXCD, CT1	0,566	0,1	0,473	0,1
CXCD, CT2	0,432	0,1	0,217	0,1
DN, CT1	0,647	0,1	0,591	0,1
DN, CT2	0,622	0,1	0,460	0,1
CT1, CT2	0,322	0,1	0,320	0,1

Debido a la baja dimensionalidad (valor de *stress* elevado) encontrada en el nMDS, según el factor estacional, y a las diferencias significativas encontradas entre estaciones en la rutina PERMANOVA, ha sido realizado el análisis canónico de coordenadas principales (CAP) a partir de la densidad de protistas y metazoos (figura 4.10), y sus grupos (figura 4.11). Los resultados han permitido encontrar ejes a través de la nube de puntos multivariante que mejor discriminan grupos de objetos, en este caso en función del factor estacional y a partir de la densidad de protistas y metazoos, siendo significativas las diferencias encontradas ($tr=0,7742$; $P=0,001$; 999 permutaciones). Los ejes del PCoA ortonormales seleccionados ($m=11$) describen el 93,96% de la variación total de la nube de puntos descritos por la matriz distancia euclídea, con el 51,43% de asignaciones correctas. Los dos primeros ejes canónicos resultantes del CAP ($\delta^2=0,34$ y $0,32$, respectivamente) han permitido separar, aunque de forma superpuesta, grupos de muestras respecto al factor estacional (figura 4.10). Con el fin de revelar aquellos gradientes de abundancia de organismos

relacionados con las estaciones que más contribuyen a la discriminación de los grupos de muestras, han sido superpuestos los vectores de correlación de Pearson ($r > 0,4$) de las variables biológicas con los ejes canónicos extraídos. Los resultados indican que *E. affinis*, *O. coarctata*, *V. convallaria* y *V. microstoma* se asocian con los periodos más fríos. Contrariamente, *P. trichophorum*, *Periacineta* sp., *Rotaria* sp., *A. tuberosa*, *P. operculata*, *Lecane* sp., *A. vulgaris* y *O. articulata* lo han hecho con periodos más cálidos. Los resultados de la validación cruzada muestran que el valor más elevado del porcentaje de asignación corresponde a otoño, siendo muy similares en el resto de estaciones (tabla 4.2). El error de mala clasificación de la validación cruzada es del 48,57%.

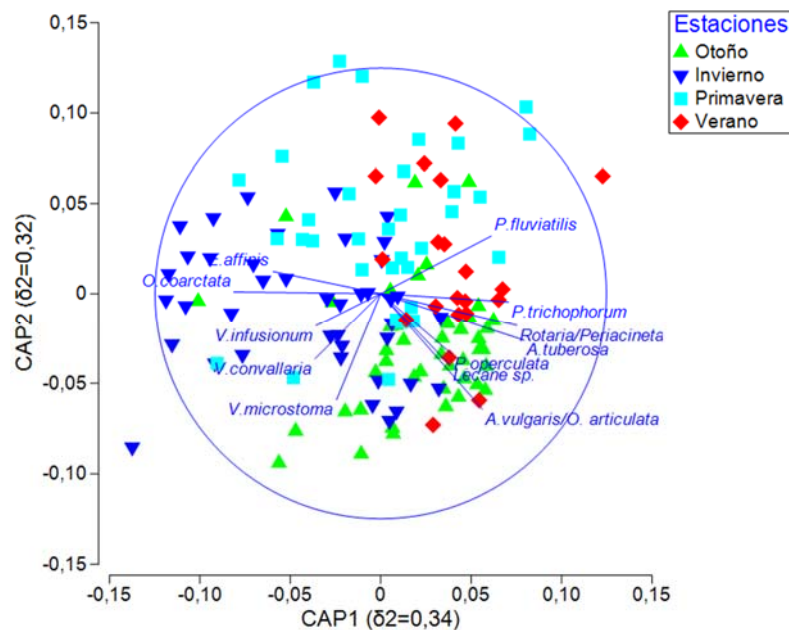


Figura 4.10. CAP a partir de la densidad de protistas y metazoos, según el factor estacional. Los vectores representan la correlación de las variables biológicas ($r > 0,4$) con los ejes canónicos. $\delta^2 =$ el cuadrado de la correlación canónica.

Los resultados de la rutina CAP a partir de la densidad de grupos y según el factor estacional han mostrado diferencias significativas entre muestras ($tr=0,4247$; $P=0,001$; 999 permutaciones). Los ejes del análisis de coordenadas principales (PCoA) ortonormales seleccionados ($m=5$) describen el 83,43% de la variación total de la nube de puntos descritos por la matriz distancia euclídea, con el 42,14% de asignaciones correctas. Los dos primeros ejes canónicos resultantes del CAP ($\delta^2=0,30$ y $0,10$, respectivamente) han permitido separar, aunque de forma superpuesta, grupos de muestras respecto al factor estacional (figura 4.10). Con el fin de revelar aquellos gradientes de abundancia de grupos de protistas y metazoos relacionados con las estaciones que más contribuyen a la discriminación de los grupos de muestras, han sido superpuestos los vectores de correlación de Pearson ($r > 0,5$) de

las variables biológicas con los ejes canónicos extraídos. Los resultados indican que los grupos de amebas testáceas, amebas, suctores, metazoos, grandes flagelados y rotíferos se asocian con los periodos más cálidos. Los resultados de la validación cruzada muestran que los valores más elevados del porcentaje de asignación corresponden a invierno y otoño, siendo bajo en el resto de estaciones (tabla 4.2).

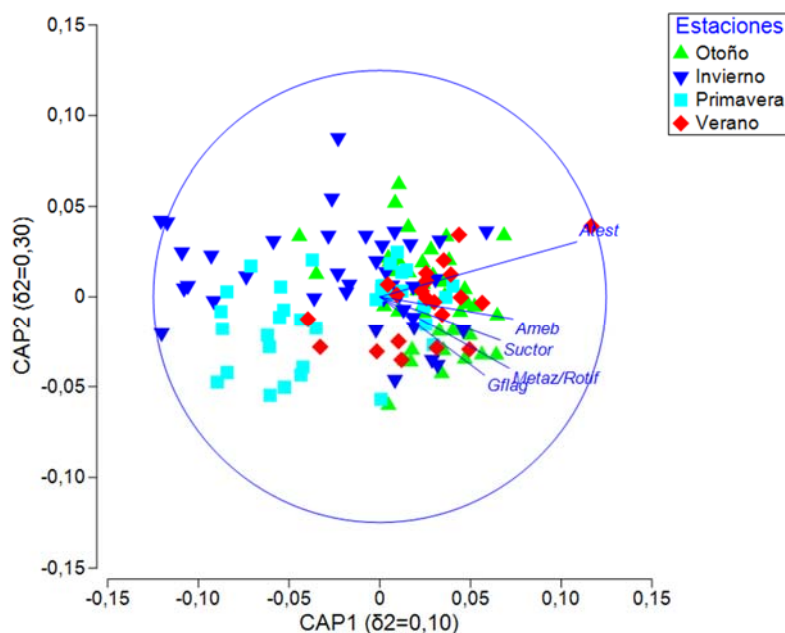


Figura 4.11. CAP a partir de la densidad de grupos de protistas y metazoos, según el factor estacional. Los vectores representan la correlación de las variables biológicas ($r > 0,5$) con los ejes canónicos. $\delta^2 =$ el cuadrado de la correlación canónica.

Tabla 4.2. Resultados de la validación cruzada de la rutina CAP a partir de las variables biológicas y según el factor estacional.

	Grupo original	Otoño	Invierno	Primavera	Verano	Total	% asignación
Protistas y metazoos	Otoño	29	5	3	7	44	66
	Invierno	11	18	7	5	41	44
	Primavera	4	6	15	9	34	44
	Verano	5	1	5	10	21	48
Grupos	Otoño	24	7	1	12	44	55
	Invierno	11	12	11	7	41	29
	Primavera	9	4	17	4	34	50
	Verano	12	0	3	6	21	29

El análisis de porcentajes de similitudes (SIMPER) ha permitido identificar los protistas y metazoos que más han contribuido (%) a la disimilitud de CT1 con el resto de biorreactores, siendo *E. plicatilis* más abundante en QB, *T.*

minuta más abundante en DN, *A. vulgaris* menos abundante en CXAB y *E. balatonica* más abundante en CT2 (tabla 4.3).

Tabla 4.3. Contribución de protistas y metazoos a la disimilitud entre biorreactores (rutina SIMPER).			
Disimilitud (%)	V. biológicas	Contribución (%)	C. acumulativa (%)
QB-CT1 (45,25)	<i>E. plicatilis</i>	6,48	6,48
	<i>A. grandes</i>	6,34	12,82
	<i>E. balatonica</i>	5,56	18,38
	<i>Lecane sp.</i>	5,08	23,46
DN-CT1 (41,67)	<i>T. minuta</i>	8,80	8,80
	<i>Entosiphon sp.</i>	6,19	14,99
	<i>A. uncinata</i>	5,15	20,14
	<i>P. trichophorum</i>	4,95	25,08
CXAB-CT1 (43,33)	<i>A. vulgaris</i>	5,20	5,20
	<i>Lecane sp.</i>	4,60	9,80
	<i>A. grandes</i>	4,56	14,35
	<i>E. plicatilis</i>	4,31	18,66
CXCD-CT1 (42,16)	<i>T. minuta</i>	5,35	5,35
	<i>A. uncinata</i>	4,61	9,96
	<i>A. vulgaris</i>	4,37	14,32
	<i>Entosiphon sp.</i>	4,05	18,38
CT2-CT1 (36,60)	<i>E. balatonica</i>	6,38	6,38
	<i>A. grandes</i>	5,87	12,25
	<i>A. uncinata</i>	5,78	18,03
	<i>P. trichophorum</i>	4,83	22,76

4.2 Protistas y metazoos bioindicadores del proceso de eliminación del nitrógeno

A continuación se aplicaron diversas técnicas estadísticas para la exploración del conjunto de variables ambientales (componentes o fracciones del nitrógeno), así como técnicas de interpretación ambiental para el estudio de la relación entre dichas variables y la comunidad de protistas y metazoos, y sus grupos.

Los resultados de la media, desviación estándar (DE) y rango (mínimo-máximo) de las distintas fracciones del nitrógeno de cada uno de los biorreactores y del conjunto de todos ellos (denominada matriz total), se encuentran detallados en las tablas 8.3 y 8.4 del anexo, respectivamente. Se han seleccionado 14 variables relacionadas con el nitrógeno, incluyendo variables fisicoquímicas del efluente (NT, NTs, NKT, NKTs, N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, %N-NO₂⁻, N-NO₃⁻ y Nox) y variables relacionadas con el rendimiento en el proceso de depuración (rNT, rNTs, rNKT, rNKTs, rN-NH₄⁺).

Los resultados de los estadísticos descriptivos reflejan diferentes escenarios relativos al proceso de nitrificación-desnitrificación (figura 4.12). Los biorreactores en CT muestran una nitrificación escasa, caracterizada por la concentración elevada del N-NH₄⁺ en el efluente. De forma contraria, DN muestra una excelente capacidad de nitrificación-desnitrificación. Los biorreactores en CX presentan en general una moderada nitrificación y una

desnitrificación incompleta, como se deduce por la elevada concentración del N-NO_3^- en el efluente. En cambio, en el biorreactor QB parecen observarse dos situaciones, es decir, periodos con una excelente nitrificación-desnitrificación y periodos con una escasa nitrificación, caracterizado este último por la elevada desviación estándar del N-NH_4^+ del efluente.

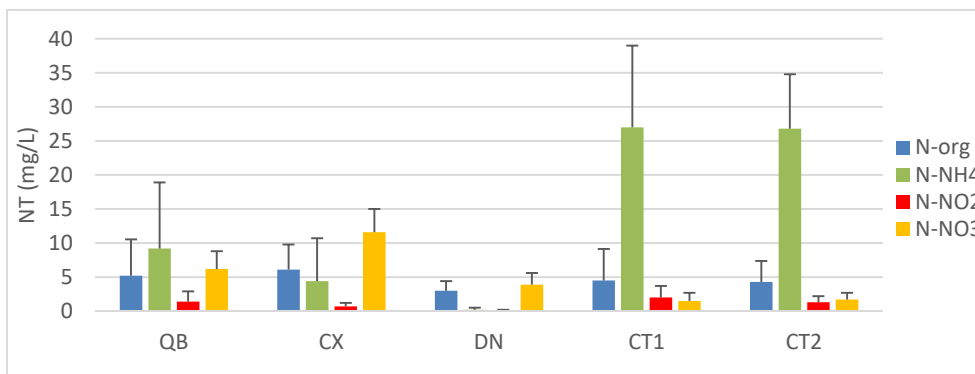


Figura 4.12. Valores promedio y desviación estándar de las fracciones del nitrógeno del efluente en los biorreactores.

El rendimiento del nitrógeno total (r_{NT}) en los distintos biorreactores, representados en el diagrama de cajas y bigotes de la figura 4.13, concuerda con los resultados anteriores, de forma que este sería secuencialmente el orden decreciente del r_{NT} : $\text{DN} > \text{QB} > \text{CX} > \text{CT}$. Además, en DN existe una escasa variación, mientras que en QB se observa una elevada variación por la mayor longitud del rango intercuartílico y distancia de los bigotes, que reflejan elevados y bajos valores del r_{NT} . En CX, la posición elevada de la mediana en el rango intercuartílico indica que el 50% de los valores de dicho rango se agrupan en un estrecho intervalo. La EDAR que peores valores del r_{NT} presenta es CT, observándose ligeras diferencias entre los biorreactores CT1 y CT2.

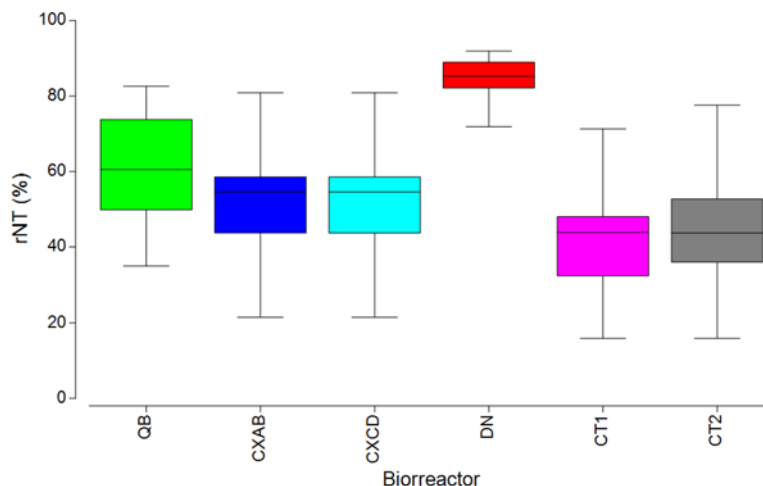


Figura 4.13. Diagrama de cajas y bigotes del rNT en los biorreactores.

Los resultados de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis indican que todas las variables relacionadas con el nitrógeno muestran diferencias significativas entre los biorreactores ($p < 0,05$). Sin embargo, si se considera el factor estacional, solo presentan relaciones significativas los siguientes componentes: NT, NTs, N-NH₄⁺, rN-NH₄⁺, NKT, rNKT y NKTs.

Tabla 4.4. Prueba de Kruskal-Wallis de los componentes del nitrógeno del efluente, según el factor biorreactor y estacional.

	Biorreactor		Estacional	
	H	p	H	p
NT	77,17	0,0001*	15,08	0,0017*
rNT	55,55	0,0001*	4,00	0,2610
NTs	48,71	0,0001*	14,84	0,0020*
rNTs	84,52	0,0001*	1,16	0,7637
N-NH ₄ ⁺	96,98	0,0001*	8,05	0,0450*
rN-NH ₄ ⁺	85,89	0,0001*	9,44	0,0240*
N-NO ₂ ⁻	59,96	0,0001*	4,88	0,1803
N-NO ₃ ⁻	109,01	0,0001*	1,36	0,7142
Nox	95,81	0,0001*	1,85	0,6051
NKT	79,95	0,0001*	10,11	0,0176*
rNKT	80,65	0,0001*	7,86	0,0489*
NKTs	83,75	0,0001*	9,99	0,0186*
rNKTs	80,90	0,0001*	7,23	0,0649
%N-NO ₂ ⁻	85,84	0,0001*	7,41	0,0599

* $p < 0,05$

La prueba de Kolmogorov-Smirnov indica una falta de normalidad en las variables NT y rNT. Por otro lado, la exploración visual del conjunto de datos, a través de los histogramas de frecuencia y gráfico de dispersión múltiple de puntos (*draftsman plot*), indica en general una falta de simetría en los datos referidos a los componentes del

nitrógeno. Por ello, todos los componentes se han transformado con la función $\text{Log}(X+1)$, donde X representa el componente, y posteriormente normalizados (rutina estandarización en PRIMER 7.0) para la homogenización de las variables con diferentes escalas de medida.

Los resultados del nMDS y análisis clúster, según el factor biorreactor y a partir de los componentes del nitrógeno, estarían de acuerdo con los obtenidos a través de la prueba de Kruskal-Wallis, encontrándose principalmente tres grupos de muestras bien definidos a partir del valor 3,8 de la distancia euclídea (figura 4.14). Uno de los grupos se encuentra formado por todas las muestras de DN y parte de las correspondientes a CX y QB. Otro se encuentra formado por la mayoría de muestras de CT1 y CT2, y parte de las correspondientes a CX y QB. El otro grupo, más pequeño que el resto, se encuentra representado por algunas muestras de CT1 y CT2.

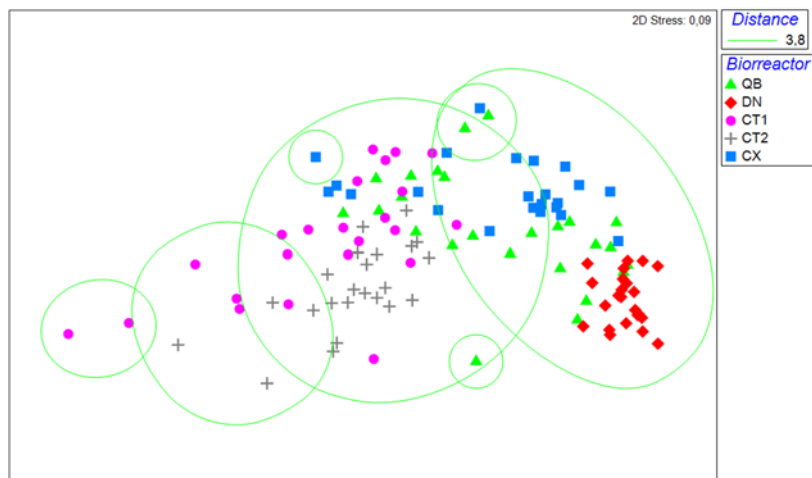


Figura 4.14. nMDS a partir de los componentes del nitrógeno del efluente, según el factor biorreactor.

Los resultados de la rutina ANOSIM de 1 vía estarían de acuerdo con el patrón espacial observado en el nMDS (4.14) y la prueba de Kruskal-Wallis (tabla 4.4), indicando que existe una buena separación entre biorreactores ($R=0,709$ y nivel de significación=0,1%) a partir de las fracciones del nitrógeno en el efluente (tabla 4.5). La mayor distancia observada corresponde a DN y los biorreactores CT1, CT2 y CX, mientras que la menor separación la muestran DN y QB. Por otro lado, la rutina PERMANOVA ($df=4$; $SS=969,59$; $MS=242,4$; $Pseudo-F=41,485$ y $p[perm]=0,001$) también pone de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre los biorreactores en relación con las fracciones del nitrógeno.

Tabla 4.5. ANOSIM de 1 vía a partir de los componentes del nitrógeno del efluente, según el factor biorreactor.

	R	Significancia (%)
BIORREACTOR	0,709	0,1
QB, CX	0,304	0,1
QB, DN	0,588	0,1
QB, CT1	0,529	0,1
QB, CT2	0,571	0,1
CX, DN	0,925	0,1
CX, CT1	0,845	0,1
CX, CT2	0,806	0,1
DN, CT1	0,993	0,1
DN, CT2	0,995	0,1
CT1, CT2	0,412	0,1

Contrariamente, los resultados de la rutinas ANOSIM ($R_{\text{global}}=-0,007$ y nivel de significación del 62,6%) y PERMANOVA ($df=3$; $SS=67,15$; $MS=22,8$; $Pseudo-F=1,6246$ y $p[\text{perm}]=0,127$) indican que los componentes del nitrógeno del efluente no muestran diferencias significativas debidas al factor estacional, no presentando además el nMDS un patrón definido de distribución estacional.

A pesar de la evidente separación entre biorreactores a partir de los componentes del nitrógeno, demostrada en el nMDS y las rutinas ANOSIM y PERMANOVA, el CAP ha sido realizado con el fin de determinar aquellos componentes que más han contribuido a la discriminación entre grupos de muestras, así como la distribución de sus valores a partir del gráfico de burbujas. Los resultados del CAP muestran diferencias significativas según el factor biorreactor ($tr=2,92$; $P=0,001$; 999 permutaciones). Los ejes del PCoA ortonormales seleccionados ($m=14$) explican el 100% de la variación total de la nube de puntos descritos por la matriz distancia euclídea, con el 92,3% de asignaciones correctas. Los dos primeros ejes canónicos resultantes del CAP ($\delta^2=0,89$ y $0,86$, respectivamente) han permitido separar, con una elevada correlación canónica, grupos de muestras según el factor biorreactor. Los vectores de correlación de Pearson ($r>0,6$), que representan las fracciones del nitrógeno, han sido superpuestos con los ejes canónicos del CAP, correlacionándose la mayoría de variables con dichos ejes y siendo especialmente elevados los siguientes: $\%N-NO_2^-$ ($r=0,82$), $N-NH_4^+$ ($r=0,83$) y $N-NO_3^-$ ($r=0,83$).

En las figuras del CAP se han representado los gráficos de burbujas correspondientes al rNTs, $N-NH_4^+$, $N-NO_3^-$ y $\%N-NO_2^-$ del efluente (figura 4.15). El gradiente del rNTs se encuentra definido por los altos valores correspondientes a DN, algunos muestreos con valores medios y altos procedentes de QB, así como los valores medios de CX (CXAB y CXCD). El gradiente del $N-NH_4^+$ se encuentra definido por las muestras de CT2 y CT1, en cuyos biorreactores se han dado los valores más elevados (>20 mg/L). Por otro lado, en QB se observa la mayor variación de la concentración del $N-NH_4^+$, mientras que CX y DN muestran valores medios-bajos y bajos, respectivamente. El $\%N-NO_2^-$ presenta un gradiente muy definido a partir del total de muestras de CT2, con valores

medios y elevados, y algunos valores medios pertenecientes a QB. Por último, el gradiente del N-NO_3^- se encuentra definido principalmente por los valores medios y altos de CX, así como algunos valores medios procedentes de QB. Los valores más bajos se han dado en CT1 y CT2, siendo mayores en este último biorreactor. Los resultados de la validación cruzada muestran un excelente porcentaje de asignación de las distintas variables en todos los biorreactores, observándose el 100% de asignaciones correctas en DN y CT2. El error de mala clasificación de la validación cruzada es muy bajo (7,70%).

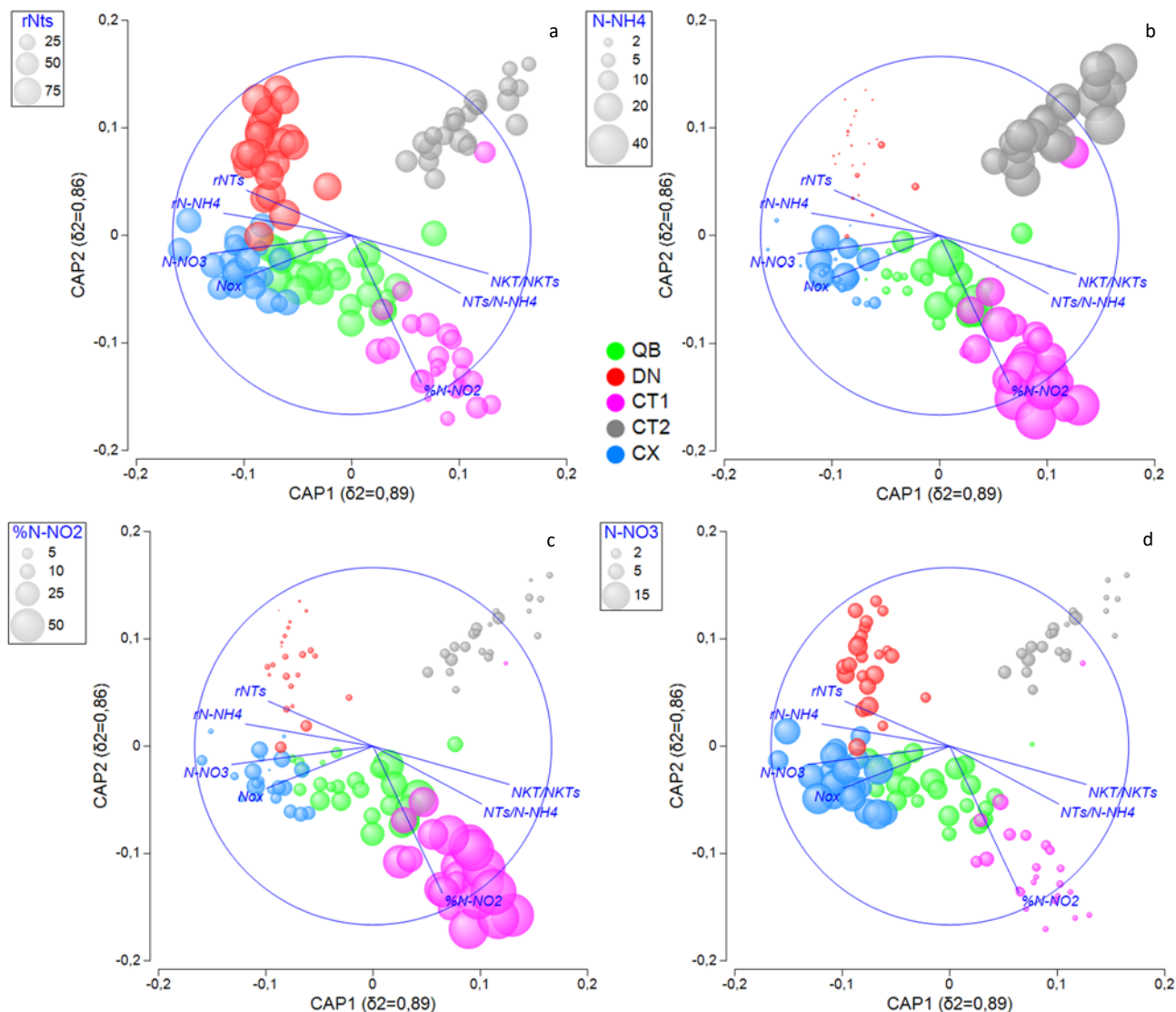


Figura 4.15. Gráfico de burbujas del CAP a partir de los componentes del nitrógeno, según el factor biorreactor. (a) Rendimiento del nitrógeno total soluble (rNTs). (b) Nitrógeno amoniacal (N-NH_4^+). (c) Porcentaje de nitrógeno nitroso ($\% \text{N-NO}_2^-$). (d) Nitrógeno nítrico (N-NO_3^-). Los vectores representan los coeficientes de correlación de Pearson de las variables ambientales ($r > 0,5$) con los ejes canónicos. $\delta^2 =$ el cuadrado de la correlación canónica.

El resultado del análisis de componentes principales (PCA), a partir de los componentes del nitrógeno y según el factor biorreactor, ha permitido extraer nuevos ejes de variación, quedando resumido en los dos primeros ejes el mayor porcentaje de variabilidad explicada (81,2%) (tabla 4.6). El primer eje se encuentra definido por las variables que dan información sobre el rendimiento del proceso de nitrificación-desnitrificación (NT, rNT, NTs, rNTs) y nitrificación (N-NH₄⁺, rN-NH₄⁺, NKT, rNKT, NKTs, rNKTs), mientras que el segundo y tercer eje quedarían definidos por aquellas variables que dan información sobre estados transitorios del proceso de nitrificación-desnitrificación (N-NO₂⁻, %N-NO₂⁻, N-NO₃⁻, Nox).

Tabla 4.6. Valores propios, variabilidad explicada por los nuevos ejes de variación del PCA y coeficientes de contribución de los componentes del nitrógeno.

Ejes	1	2	3	4
Valores propios	9,26	2,16	1,20	0,50
% variación	66,2	15,4	8,7	3,6
% variación acumulada	66,2	81,2	90,3	93,9
Componentes del nitrógeno				
NT	0,302	-0,200	0,091	-0,253
rNT	-0,284	0,056	-0,276	-0,313
NTs	0,301	-0,192	0,133	-0,230
rNTs	-0,285	-0,049	-0,254	-0,435
N-NH ₄ ⁺	0,309	-0,024	-0,167	-0,234
r N-NH ₄ ⁺	-0,300	-0,181	-0,062	-0,157
N-NO ₂ ⁻	0,161	-0,440	-0,435	-0,012
N-NO ₃ ⁻	-0,174	-0,453	0,452	-0,020
Nox	-0,121	-0,593	0,276	0,004
NKT	0,313	-0,038	-0,105	-0,291
rNKT	-0,293	-0,107	-0,225	0,067
NKTs	0,317	-0,027	-0,058	-0,274
rNKTs	-0,295	-0,130	-0,216	-0,193
%N-NO ₂ ⁻	0,174	-0,322	-0,469	0,561

Previa a la aplicación de la rutina BIO-ENV para la exploración de las relaciones entre las variables del nitrógeno y las variables biológicas (protistas y metazoos, y sus grupos), se utilizó el gráfico múltiple de dispersión de puntos y la matriz de correlación de Pearson entre pares de variables ambientales con el fin de examinar la colinealidad. Los resultados indican elevados coeficientes de correlación ($r > 0,95$), y por lo tanto, colinealidad de los siguientes pares de variables: NT-NTs y NKT-NKTs. Se han excluido las variables NT y NKT, debido a que incluyen el nitrógeno orgánico particulado procedente de la pérdida de SST en el efluente. El análisis BIO-ENV muestra las cinco mejores combinaciones, en orden decreciente según sus coeficientes de correlación de Spearman, empleando un máximo de 5 componentes (tabla 4.7). Las variables rNT, NTs, rNTs, N-NH₄⁺ y Nox no han sido seleccionadas en ninguna de las combinación propuestas, mientras que el rN-NH₄⁺ y %N-NO₂⁻ se incluyen en todas.

Tabla 4.7 Ranking de las mejores combinaciones de componentes del nitrógeno y correlaciones de Spearman para protistas y metazoos, y sus grupos (rutina BIO-ENV).

	Protistas y metazoos					Grupos				
rNT										
NTs										
rNTs										
N-NH ₄ ⁺										
rN-NH ₄ ⁺	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
N-NO ₂ ⁻				X						
N-NO ₃ ⁻	X	X		X	X			X	X	
Nox										
rNKT	X			X	X		X	X		X
NKTs										
rNKTs	X	X	X	X		X	X	X	X	
%N-NO ₂ ⁻	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
BIO-ENV (Rho)	0,472	0,469	0,458	0,457	0,455	0,447	0,441	0,438	0,431	0,430

4.2.1 Descripción de los modelos lineales de regresión múltiple multivariante basados en la distancia

Previa a la aplicación de la rutina de regresión lineal múltiple multivariante (DISTLM), se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson con el fin de determinar la colinealidad entre las diferentes variables. Los resultados indican un mayor coeficiente ($r > 0,85$) entre las siguientes variables: NKTs y N-NH₄⁺, Nox y N-NO₃⁻, NKTs y NTs, rNKT y rNKTs, rNT y rNTs. El criterio general para la exclusión de una de las variables de cada pareja ha sido la ausencia o escasa presencia en las mejores combinaciones encontradas en la rutina BIO-ENV, como son el Nox y el rNKT (tabla 4.7). En el caso del rNT-rNTs se excluyó el rNT, ya que este componente incluye la fracción del nitrógeno orgánico de los SSLM que se escapan con el efluente tratado. Entre el NTs y el NKTs se decidió eliminar esta última variable, debido a que su información en el proceso biológico es muy similar a la aportada por el N-NH₄⁺ si no existe ausencia de depuración, como es el caso de las EDAR estudiadas.

Los modelos lineales de regresión se han explorado inicialmente en cada uno de los biorreactores, a excepción de CXAB y CXCD, que han sido explorados conjuntamente debido a la ausencia de diferencias significativas respecto a los componentes del nitrógeno (tabla 4.8). La estrategia ha sido la construcción de modelos a partir de criterios y procedimientos parsimoniosos (*step-wise/AICc*), a excepción de QB, CT2 y DN, en cuyos casos se han utilizado otros procedimientos para incluir más de una variable biológica en los modelos (*forward/adjusted R²*). Los biorreactores CX y CT1 muestran la mayor variación explicada por los ejes del dbrDA extraídos, mientras que en CT2, DN y QB ha sido moderada y baja, respectivamente.

Tabla 4.8. Porcentaje de variación explicada de protistas y metazoos por los ejes individuales en la rutina DISTLM en cada uno de los biorreactores y a partir de los componentes del nitrógeno.

Biorreactor	Criterio/Procedimiento	Eje	Variación explicada del modelo ajustado		Variación explicada del total de la variación	
			Individual	Acumulada	Individual	Acumulada
QB	<i>forward/adj. R²</i>	1	61,70	61,76	8,34	8,34
		2	38,24	100	5,16	13,5
CX	<i>step-wise /AICc</i>	1	86,15	86,15	43,69	43,69
		2	10,90	97,06	5,53	49,21
		3	2,94	100	1,49	50,71
CT1	<i>step-wise /AICc</i>	1	65,76	65,76	28,26	28,26
		2	24,27	90,04	10,43	38,69
		3	9,96	100	4,28	42,97
CT2	<i>forward/adj. R²</i>	1	54,42	54,42	12,97	12,97
		2	23,77	78,19	5,67	18,64
		3	21,81	100	5,2	23,84
DN	<i>forward/adj. R²</i>	1	56,95	56,95	12,25	12,95
		2	33,61	90,57	7,23	19,48
		3	9,43	100	2,03	21,25

El modelo lineal multivariante seleccionado en QB establece que el 13,5% de la variación en la abundancia de protistas y metazoos fue atribuida al N-NH₄⁺ y rendimiento del nitrógeno kjeldhal total soluble (rNKTs) (tabla 4.8). Los resultados del test secuencial indican que el N-NH₄⁺ contribuye con el mayor porcentaje de variación (8,33%) respecto al total. Los coeficientes de correlación múltiple parcial en el modelo muestran una correlación negativa elevada del N-NH₄⁺ en el efluente y positiva del rNKTs con el dbRDA1 y dbRDA2, respectivamente, si bien este último componente no resulta significativo ($p=0,219$) (tabla 4.9).

Los coeficientes de correlación de Pearson de las abundancias de las distintas especies de protistas y metazoos con cada uno de los ejes del dbRDA han sido calculados para identificar su respuesta debido a la variación del N-NH₄⁺ y rNKTs (tabla 4.9). Los protistas y metazoos más relacionados ($r>0,30$) con valores bajos del N-NH₄⁺ han sido los siguientes: *Rotaria* sp., *P. trichophorum*, *T. minuta*, *Lecane* sp. y *E. chrysemidis*. El diagrama de burbujas del N-NH₄⁺ representado en la figura del análisis de redundancia basado en la distancia (dbRDA) indica que la abundancia de dichos organismos se encuentra asociada a valores del N-NH₄⁺ inferiores a 4 mg/L (figura 4.16). Contrariamente, *V. microstoma*, *V. convallaria*, *V. aquadulcis*, *O. coarctata* y *E. affinis* se relacionan aproximadamente ($r>-0,30$) con valores por encima de 10 mg/L.

Tabla 4.9 Coeficientes de correlación múltiple parcial de los componentes del nitrógeno y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbRDA en QB.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2
QB	N-NH₄⁺	-0,931	0,365
	rNKTs	0,365	0,931
	<i>P. trichophorum</i>	0,41	0,18
	<i>E. affinis</i>	-0,54	0,082
	<i>T. minuta</i>	0,30	0,07
	<i>E. chrysemidis</i>	0,36	0,04
	<i>V. aquadulcis</i>	-0,35	0,28
	<i>V. convallaria</i>	-0,31	0,19
	<i>V. microstoma</i>	-0,38	0,21
	<i>O. coarcatata</i>	-0,45	-0,39
	<i>Rotaria</i> sp.	0,46	0,14
	<i>Lecane</i> sp.	0,34	0,01

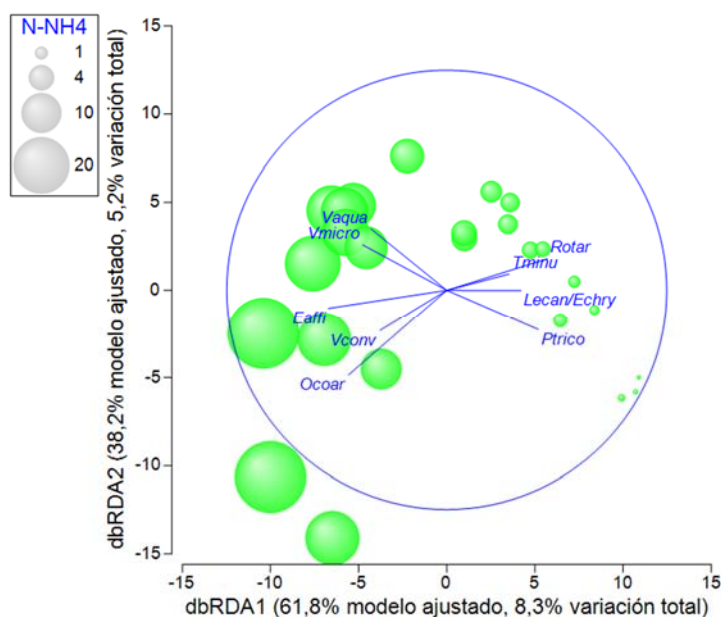


Figura 4.16. Gráfico de burbujas del N-NH₄⁺ en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre componentes del nitrógeno y densidad de protistas y metazoos en QB. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson de las variables biológicas mayores de 0,30 y -0,30.

El modelo lineal multivariante seleccionado en CX establece que el 50,71% de la variación de protistas y metazoos fue atribuida al N-NH₄⁺, rNKTs y rNTs (tabla 4.8). Los resultados del test secuencial indican que el N-NH₄⁺ ha contribuido en el modelo con el mayor porcentaje de variación (43,49%) respecto al total. El mayor porcentaje de contribución de estos componentes se ha observado en el primer eje del dbRDA (86,15% de la variación del modelo ajustado), explicando el 43,69% de la variación de protistas y metazoos. Los coeficientes de correlación múltiple

parcial en el modelo indican una correlación positiva elevada del N-NH₄⁺ y rNKTs con el dbRDA1 y dbRDA3, respectivamente, mientras que de forma negativa lo hace el rNTs con el dbRDA2 (tabla 4.10).

Los coeficientes de correlación de Pearson de la abundancia de las distintas especies de protistas y metazoos con cada uno de los ejes del dbRDA han sido calculados para identificar su respuesta debido a la variación del N-NH₄⁺, rNKTs y rNTs (tabla 4.10). Los protistas y metazoos más relacionados ($r > -0,40$) con valores bajos del N-NH₄⁺ han sido los siguientes: *Rotaria* sp., *P. trichophorum*, *Lecane* sp., *E. sulcatum*, *A. vulgaris*, *P. operculata*, amebas desnudas grandes, amebas desnudas pequeñas, *A. tuberosa*, *Periacineta* sp., *U. nigricans*, *P. fluviatilis*, *G. membranaceus*, *O. articulata*, *E. plicatilis* y *E. balatonica*. El diagrama de burbujas del N-NH₄⁺ representado en la figura del dbRDA indica que la abundancia de dichos organismos se encuentra asociada a valores del N-NH₄⁺ inferiores a 2 mg/L (figura 4.17). Para una mejor visualización de la figura han sido representadas solo aquellas especies con coeficientes de correlación mayores de -0,80. De forma contraria, *T. minuta*, *V. convallaria*, *V. aquadulcis*, *O. coarctata* y *E. affinis* se relacionan aproximadamente ($r > 0,40$) con valores por encima de 10 mg/L. *Bodo saltans* se ha relacionado ($r = 0,40$) con valores elevados del rNTs y rNKTs en el dbRDA3.

Tabla 4.10. Coeficientes de correlación múltiple parcial de los componentes del nitrógeno y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbRDA en CX.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3
CX	N-NH₄⁺	0,869	0,341	0,357
	rNTs	0,057	-0,788	0,614
	rNKTs	-0,491	0,513	0,704
	<i>Bodo saltans</i>	0,23	-0,29	0,40
	<i>P. trichophorum</i>	-0,80	-0,12	0,18
	<i>E. sulcatum</i>	-0,75	-0,19	-0,06
	<i>A. vulgaris</i>	-0,65	0,12	-0,09
	<i>P. operculata</i>	-0,46	0,07	0,01
	A. grandes	-0,45	0,20	0,21
	A. pequeñas	-0,42	0,21	0,10
	<i>A. tuberosa</i>	-0,81	-0,12	0,01
	<i>Periacineta</i> sp.	-0,72	-0,07	0,20
	<i>U. nigricans</i>	-0,46	-0,22	0,15
	<i>E. affinis</i>	0,48	-0,28	0,22
	<i>P. fluviatilis</i>	-0,43	0,05	0,14
	<i>T. minuta</i>	0,51	0,36	0,13
	<i>G. membranaceus</i>	-0,47	0,35	0,04
	<i>O. articulata</i>	-0,59	-0,20	-0,15
	<i>E. plicatilis</i>	-0,79	-0,04	0,04
	<i>E. balatonica</i>	-0,61	0,04	0,08
	<i>V. aquadulcis</i>	0,40	-0,23	0,06
	<i>V. convallaria</i>	0,45	-0,27	-0,11
	<i>O. coarctata</i>	0,77	-0,15	0,02
	<i>Rotaria</i> sp.	-0,71	-0,09	0,13
	<i>Lecane</i> sp.	-0,80	-0,02	-0,05

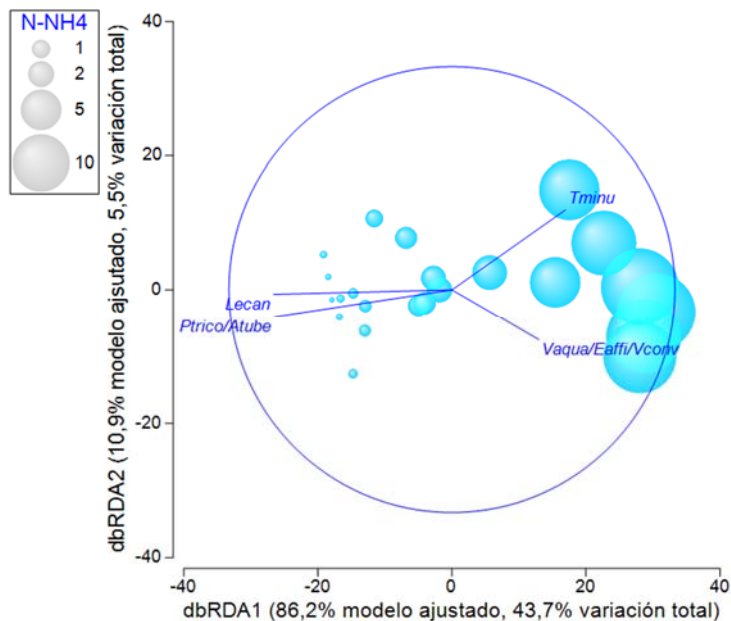


Figura 4.17. Gráfico de burbujas del N-NH₄⁺ en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre componentes del nitrógeno y densidad de protistas y metazoos en CX. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson de las variables biológicas mayores de 0,40 y -0,80.

El modelo lineal multivariante seleccionado en CT1 establece que el 42,97% de la variación de la abundancia de protistas y metazoos fue atribuida al N-NO₃⁻, N-NO₂⁻ y NTs (tabla 4.8). Los resultados del test secuencial indican que el N-NO₃⁻ ha contribuido en el modelo con el mayor porcentaje de variación (21,24%) respecto al total. Los coeficientes de correlación múltiple parcial indican una correlación negativa elevada del N-NO₃⁻ y NTs en el efluente con el dbRDA1 y dbRDA3, respectivamente, mientras que de forma positiva y elevada lo hace el N-NO₂⁻ con el dbRDA2 (tabla 4.11). Además, de forma positiva moderada lo hace el NTs con el dbRDA1, mientras que de forma negativa lo hace el N-NO₃⁻ con el dbRDA3.

Los coeficientes de correlación de Pearson de las distintas especies de protistas y metazoos con cada uno de los ejes del dbRDA han sido calculados para identificar su respuesta debido a la variación del N-NO₃⁻, N-NO₂⁻ y NTs (tabla 4.11). Los protistas y metazoos relacionados ($r > -0,40$) con valores más altos del N-NO₃⁻ y bajos del NTs del efluente han sido los siguientes: *P. trichophorum*, *Lecane* sp., *A. punctatus*, *A. vulgaris*, *P. fluviatilis*, *O. articulata*, *A. uncinata*, *V. convallaria*, *C. polypinum*, *V. microstoma* y *V. infusionum*. El diagrama de burbujas del dbRDA de la figura 4.18 representa la proporción del NTs y N-NO₃⁻, asociándose la abundancia de dichos organismos a valores entre 17-40 y 0,57-2 mg/L, respectivamente. De forma contraria, *V. aquadulcis* y *A. cicada* se relacionan ($r > 0,40$) con valores del NTs y N-NO₃⁻ por encima de 40 y 2 mg/L, respectivamente. Por otro lado, *A. cicada* y *U. nigricans* se relacionan

aproximadamente ($r > -0,40$) con valores del $N-NO_2^-$ inferiores a 2 mg/L, mientras que *A. uncinata* lo hace ($r > 0,40$) con valores elevados en el dbRDA2.

Tabla 4.11. Coeficientes de correlación múltiple parcial de los componentes del nitrógeno y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbRDA en CT1.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3
CT1	N-NO₃⁻	-0,783	-0,093	-0,615
	N-NO₂⁻	0,117	0,949	-0,292
	NTs	0,611	-0,300	-0,732
	<i>P. trichophorum</i>	-0,66	0,07	-0,29
	<i>A. vulgaris</i>	-0,74	-0,32	-0,09
	<i>A. punctatus</i>	-0,51	-0,15	-0,32
	<i>U. nigricans</i>	0,15	-0,65	-0,14
	<i>A. cicada</i>	0,44	-0,50	-0,03
	<i>P. fluviatilis</i>	-0,65	0,01	0,37
	<i>A. uncinata</i>	-0,74	0,47	0,01
	<i>O. articulata</i>	-0,79	-0,14	-0,14
	<i>V. aquadulcis</i>	0,43	-0,07	0,11
	<i>V. convallaria</i>	-0,45	-0,38	0,05
	<i>C. polypinum</i>	-0,44	-0,24	-0,04
	<i>V. microstoma</i>	-0,63	-0,24	-0,04
	<i>V. infusionum</i>	-0,51	0,04	-0,62
	<i>Lecane sp.</i>	-0,63	-0,12	-0,08

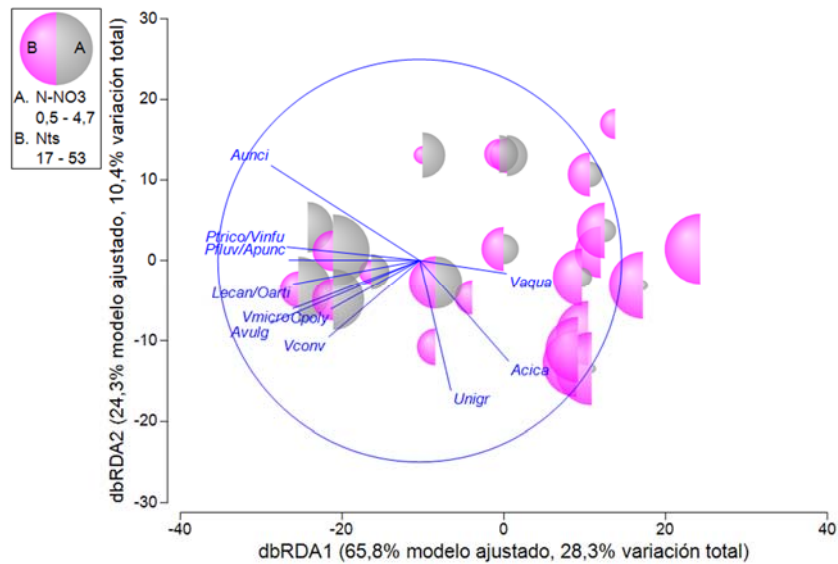


Figura 4.18. Gráfico de burbujas del NTs y $N-NO_3^-$ en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre componentes del nitrógeno y densidad de protistas y metazoos en CT1. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson de las variables biológicas mayores de 0,40 y -0,40.

El modelo lineal multivariante seleccionado en CT2 establece que el 23,84% de la variación de la abundancia de protistas y metazoos fue atribuida al N-NO₃⁻, N-NO₂⁻ y NTs (tabla 4.8). Los resultados del test secuencial indican que el NTs ha contribuido en el modelo con el mayor porcentaje de variación (12,73%) respecto al total. Los coeficientes de correlación múltiple parcial indican una correlación positiva elevada del NTs en el efluente con el dbRDA1 y negativa del N-NO₃⁻ y N-NO₂⁻ con el dbRDA2 y dbRDA3, respectivamente, no siendo significativa la relación de estos dos últimos componentes ($p=0,254$ y $0,188$) (tabla 4.12).

Los coeficientes de correlación de Pearson de las distintas especies de protistas y metazoos con cada uno de los ejes del dbRDA han sido calculados para identificar su respuesta debido a la variación del N-NO₃⁻, N-NO₂⁻ y NTs (tabla 4.12). Los protistas y metazoos más relacionados ($r>0,30$) con valores bajos del NTs han sido los siguientes: *Rotaria* sp., *Lecane* sp., *A. vulgaris*, *L. lamella*, *A. tuberosa* y *O. articulata*. El diagrama de burbujas del NTs representado en la figura del dbRDA indica que la abundancia de dichos organismos se encuentra asociada a valores del NTs entre 20-30 mg/L (figura 4.19). De forma contraria, *G. membranaceous*, *V. convallaria*, *A. cicada* y *C. polypinum* se relacionan aproximadamente ($r>0,30$) con valores por encima de 30 mg/L.

Tabla 4.12. Coeficientes de correlación múltiple parcial de los componentes del nitrógeno y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbRDA en CT2.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3
CT2	NTs	0,901	-0,336	-0,275
	N-NO₃⁻	-0,319	-0,942	0,104
	N-NO₂⁻	-0,294	-0,006	-0,956
	<i>A. vulgaris</i>	-0,46	0,21	-0,02
	<i>L. lamella</i>	-0,38	-0,14	-0,26
	<i>A. tuberosa</i>	-0,58	-0,33	-0,24
	<i>A. cicada</i>	0,31	0,26	-0,08
	<i>G. membranaceous</i>	0,36	0,05	-0,15
	<i>O. articulata</i>	-0,51	0,46	0,11
	<i>V. convallaria</i>	0,51	0,06	0,01
	<i>C. polypinum</i>	0,72	-0,11	-0,04
	<i>Lecane</i> sp.	-0,36	0,26	0,12
	<i>Rotaria</i> sp.	-0,30	-0,09	0,35

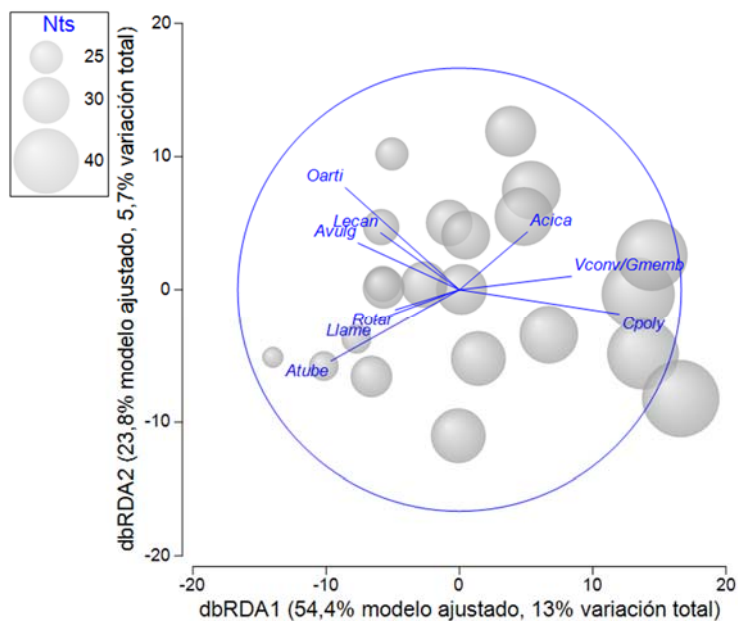


Figura 4.19. Gráfico de burbujas del NTs en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre los componentes del nitrógeno y densidad de protistas y metazoos en CT2. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson de las variables biológicas mayores de 0,30 y -0,30.

El modelo lineal multivariante seleccionado en DN establece que el 21,25% de la variación de protistas y metazoos se atribuye a las variables N-NO₃⁻, N-NO₂⁻ y NTs (tabla 4.8). Los resultados del test secuencial indican que el N-NO₃⁻ ha contribuido en el modelo con el mayor porcentaje de variación (10,36%) respecto al total. Los coeficientes de correlación múltiple parcial indican una correlación negativa elevada del N-NO₃⁻ y NTs en el efluente con el dbRDA1 y dbRDA3, respectivamente, moderada positiva del NTs y N-NO₂⁻ con el dbRDA2, y moderada del N-NO₂⁻ con el dbRDA3. Las variables N-NO₂⁻ y NTs no han sido consideradas significativas en el modelo ($p=0,148$ y $0,4$) (tabla 4.13).

Los coeficientes de correlación de Pearson de las distintas especies de protistas y metazoos con cada uno de los ejes del dbRDA han sido calculados para identificar su respuesta a la variación del N-NO₃⁻, N-NO₂⁻ y NTs (tabla 4.13). Los protistas y metazoos más relacionados ($r>0,30$) con valores elevados del N-NO₃⁻ en el efluente han sido los siguientes: *P. trichophorum*, *P. operculata*, *G. membranaceus*, *E. balatonica*, *C. polypinum*, *V. convallaria*, *V. microstoma* y *O. articulata*. El diagrama de burbujas del dbRDA de la figura 4.20 representa la proporción del NTs y N-NO₃⁻, asociándose la abundancia de dichos organismos a valores del N-NO₃⁻ entre 4-7,2 mg/L y a algunos muestreos con valores del NTs del efluente inferiores a 6 mg/L. De forma contraria, *E. sulcatum*, amebas pequeñas, *P. fluviatilis* y *T.*

minuta se relacionan ($r > 0,30$) con valores del N-NO_3^- inferiores a 4 mg/L, coincidiendo con valores del NTs superiores a 6 mg/L.

Tabla 4.13. Coeficientes de correlación múltiple parcial de los componentes del nitrógeno y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbRDA en DN.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3
DN	N-NO₃⁻	-0,934	0,320	0,160
	N-NO₂⁻	0,343	0,673	0,655
	NTs	0,102	0,667	-0,740
	<i>P. trichophorum</i>	-0,30	-0,09	-0,03
	<i>E. sulcatum</i>	0,53	-0,05	0,01
	<i>P. operculata</i>	-0,40	-0,05	0,01
	A. pequeñas	0,50	0,04	-0,21
	<i>P. fluviatilis</i>	0,46	0,07	-0,01
	<i>T. minuta</i>	0,38	0,06	-0,14
	<i>G. membranaceus</i>	-0,49	0,13	-0,22
	<i>O. articulata</i>	-0,33	0,39	0,02
	<i>E. balatonica</i>	-0,45	0,33	0,17
	<i>C. polypinum</i>	-0,42	0,04	-0,06
	<i>V. convallaria</i>	-0,33	-0,27	-0,13
	<i>V. microstoma</i>	-0,38	-0,10	0,14

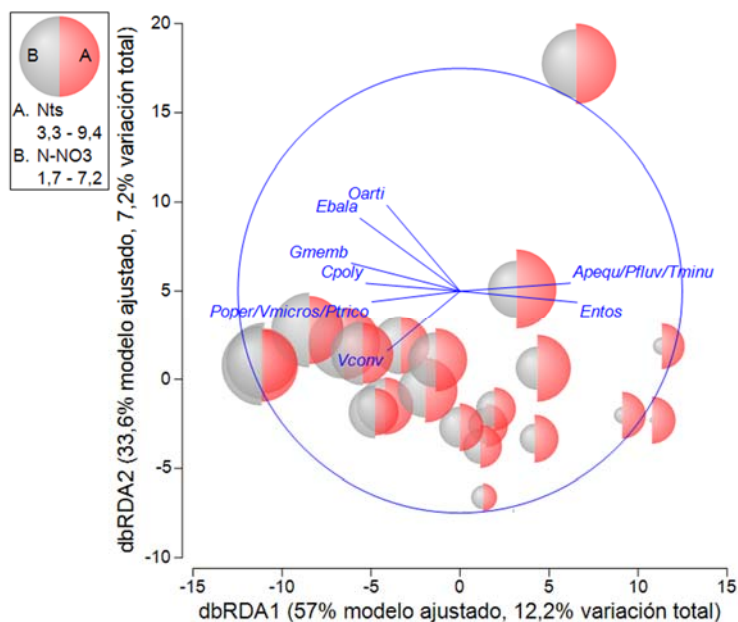


Figura 4.20. Gráfico de burbujas del NTs y N-NO₃⁻ en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre componentes del nitrógeno y densidad de protistas y metazoos en DN. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson de las variables biológicas mayores de 0,30 y -0,30.

El modelo lineal multivariante, seleccionado a partir de la matriz que engloba el conjunto de biorreactores (matriz total) con el procedimiento *step-wise* y criterio AIC_C (tabla 4.14), indica que el 35,43% de la variación de protistas y metazoos fue explicada por la secuencia de variación de los siguientes componentes del nitrógeno: N-NH₄⁺ (13,4%), N-NO₃⁻ (7,6%), rNKTs (2,9%), rNTs (4,6%), %N-NO₂⁻ (2,7%), NTs (1,9%), N-NO₂⁻ (1,3%) y rN-NH₄⁺ (1,1%). En el caso de los grupos, el mejor modelo lo componen cinco variables para explicar el 29,78% de la variación, siendo esta la secuencia: rNKTs (16,5%), rNTs (4,3%), %N-NO₂⁻ (4,5%), N-NO₂⁻ (2,6%) y N-NO₃⁻ (1,9%). El modelo lineal seleccionado con el procedimiento *step-wise* y criterio BIC excluye del modelo de protistas y metazoos los siguientes componentes: rN-NH₄⁺, N-NO₂⁻ y NTs, mientras que en el modelo de grupos excluye el N-NO₃⁻ y N-NO₂⁻. En el caso de protistas y metazoos, la variación explicada del total de la variación fue del 31,16%, mientras que en el caso de sus grupos fue del 25,32%.

Tabla 4.14. Porcentaje de la variación explicada por los ejes individuales de la rutina DISTLM entre componentes del nitrógeno y la densidad de protistas y metazoos, y sus grupos.

Eje	Protistas y metazoos				Grupos			
	Variación explicada del modelo ajustado		Variación explicada del total de la variación		Variación explicada del modelo ajustado		Variación explicada del total de la variación	
	Individual	Acumulada	Individual	Acumulada	Individual	Acumulada	Individual	Acumulada
1	48,40	48,40	17,15	17,5	73,51	73,51	21,89	21,89
2	23,79	72,18	8,43	25,58	17,34	90,85	5,16	27,05
3	13,09	85,27	1,64	30,21	5,79	96,63	1,72	28,77
4	6,51	91,78	2,31	32,52	2,54	99,17	0,76	29,53
5	4,29	96,07	1,52	34,04	0,83	100	0,25	29,78
6	2,84	98,91	1,01	35,05	-	-	-	-
7	0,99	99,91	0,35	35,40	-	-	-	-
8	0,09	100	0,03	35,43	-	-	-	-

Los coeficientes de correlación múltiple parcial de cada componente del nitrógeno calculados en la rutina DISTLM de la matriz total de protistas y metazoos indican aquellos que se encuentran representados de forma significativa en los ejes del dbRDA (tabla 4.15). En el dbRDA que representa las variables, el primer eje se encuentra negativamente relacionado con el rNKTs y rN-NH₄⁺, mientras que de forma positiva lo hace el N-NH₄⁺ y el %N-NO₂⁻ del efluente (figura 4.21). Dicho eje, que explica el 17,5% del total de la variación del modelo, define el rendimiento en el proceso de nitrificación. El segundo eje, que explica el 8,43% del total de la variación, se encuentra positivamente relacionado con la concentración del N-NO₃⁻ del efluente. El tercer eje, que explica el 1,64%, se encuentra positivamente relacionado con el rNTs y negativamente con el NTs del efluente, representando el rendimiento en el proceso global de eliminación del nitrógeno (nitrificación-desnitrificación).

Los coeficientes de correlación de Pearson de las distintas especies de protistas y metazoos con cada uno de los ejes del dbRDA han sido calculados para identificar su respuesta debido a la variación del N-NH_4^+ , rNKTs , $\% \text{N-NO}_2^-$, N-NO_3^- y rNTs (tabla 4.15). *P. trichophorum*, *E. sulcatum*, *Rotaria* sp., *Lecane* sp. y *A. tuberosa* muestran los coeficientes de correlación negativos más elevados ($r > -0,50$) con el primer eje, mientras que *A. vulgaris*, *P. operculata*, amebas desnudas grandes y pequeñas, *Periacineta* sp., *P. fluviatilis*, *E. plicatilis*, *A. uncinata* y *O. articulata* presentan coeficientes de correlación negativos moderados (entre $-0,30$ y $-0,50$). Por otro lado, *Trochilia minuta* muestra un coeficiente de correlación moderado-bajo negativo ($r = -0,31$) con el primer eje y positivo ($r = 0,38$) con el tercero. Los diagramas de burbujas representados en la figura del dbRDA indican que la abundancia de dichos organismos se asocia a valores del N-NH_4^+ inferiores a 5 mg/L (figura 4.21), principalmente por debajo de 2 mg/L , y valores del rNKTs superiores al 75% (figura 4.22), así como valores del $\% \text{N-NO}_2^-$ inferiores al 10% . Contrariamente, *O. coarctata*, *V. aquadulcis* y *A. cicada* se relacionan ($r > 0,30$) en el primer eje con valores del N-NH_4^+ superiores a 10 mg/L , inferiores al 75% del rNKTs , así como valores del $\% \text{N-NO}_2^-$ superiores al 15% . La elevada relación ($r > 0,50$) de *E. affinis* y *O. coarctata* con valores superiores a 10 mg/L de N-NO_3^- , así como la relación moderada-baja ($r = 0,30-0,50$) en el caso de *E. plicatilis*, *V. convallaria*, *C. polypinum* y *V. infusionum*, se observa principalmente en las muestras de QB y CX (figura 4.23). Por último, *E. plicatilis*, *G. membranaceus* y *Periacineta* sp. se encuentran relacionados ($r > -0,30$) en el tercer eje con valores del rNTs del 50% , mientras que *T. minuta* lo hace por encima del 75% (figura 4.24).

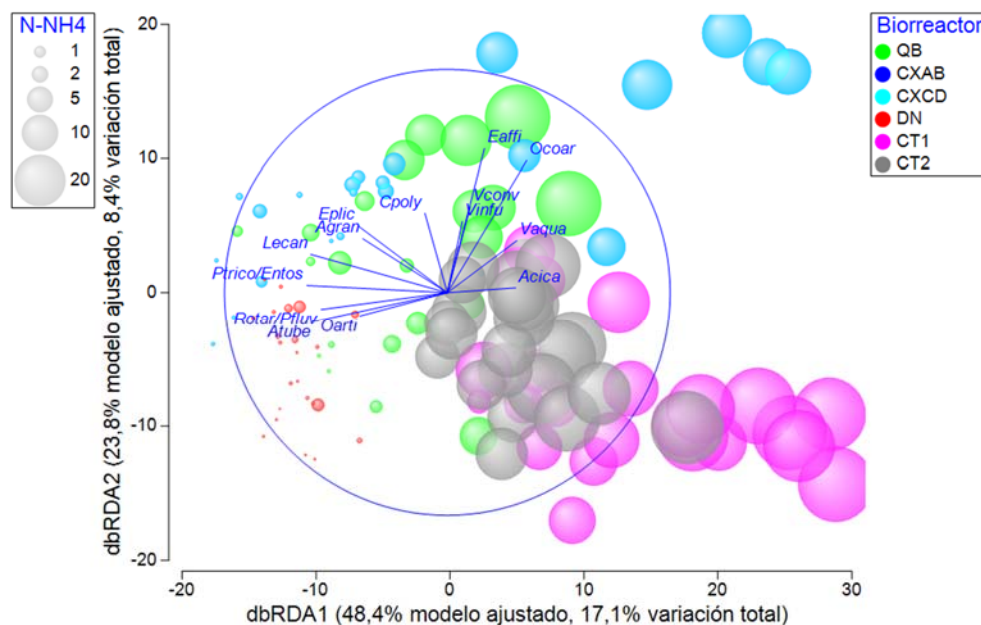


Figura 4.21. Gráfico de burbujas del N-NH_4^+ en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre componentes del nitrógeno y la densidad de protistas y metazoos de la matriz total. Los vectores superpuestos corresponden a los coeficientes de correlación de Pearson de las variables biológicas mayores de $0,30$ y $-0,40$.

Tabla 4.15. Coeficientes de correlación múltiple parcial de los componentes del nitrógeno y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbRDA en la matriz total.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3
Matriz total	rNKTs	-0,575	-0,157	-0,384
	rNTs	-0,010	0,287	0,620
	%N-NO₂⁻	0,395	-0,054	-0,130
	N-NO₂⁻	0,141	-0,022	0,104
	N-NO₃⁻	-0,206	0,876	-0,076
	N-NH₄⁺	0,370	0,222	-0,028
	NTs	0,310	0,253	-0,657
	rN-NH₄⁺	-0,467	0,091	-0,043
	<i>B. saltans</i>	0,06	0,16	0,14
	<i>P. trichophorum</i>	-0,63	0,03	-0,05
	<i>E. sulcatum</i>	-0,59	0,03	0,02
	<i>A. vulgaris</i>	-0,33	-0,28	-0,02
	<i>P. operculata</i>	-0,35	0,05	-0,14
	Amebas grandes	-0,38	0,24	-0,15
	Amebas pequeñas	-0,31	0,12	-0,06
	<i>L. lamella</i>	-0,06	0,26	-0,14
	<i>A. punctatus</i>	-0,16	0,10	-0,15
	<i>T. infusioenum</i>	0,25	-0,19	-0,28
	<i>A. tuberosa</i>	-0,60	-0,13	0,01
	<i>Periacineta</i> sp.	-0,36	0,12	-0,33
	<i>U. nigricans</i>	-0,03	0,13	-0,25
	<i>A. cicada</i>	0,31	0,02	-0,14
	<i>E. affinis</i>	0,17	0,65	0,07
	<i>P. fluviatilis</i>	-0,40	-0,04	0,05
	<i>T. minuta</i>	-0,31	0,23	0,38
	<i>G. membranaceus</i>	-0,15	0,02	-0,37
	<i>A. uncinata</i>	-0,37	0,14	0,16
	<i>O. articulata</i>	-0,40	-0,11	0,08
	<i>E. plicatilis</i>	-0,40	0,30	-0,33
	<i>E. chrysemidis</i>	0,02	0,06	0,09
	<i>E. balatonica</i>	-0,21	0,06	0,06
	<i>V. aquadulcis</i>	0,31	0,23	-0,19
	<i>V. convallaria</i>	0,10	0,39	0,09
	<i>C. polypinum</i>	-0,10	0,36	-0,25
	<i>O. coarctata</i>	0,36	0,59	0,21
	<i>V. microstoma</i>	0,11	0,27	-0,23
	<i>V. infusioenum</i>	0,07	0,32	-0,13
	<i>Rotaria</i> sp.	-0,57	-0,08	0,01
	<i>Lecane</i> sp.	-0,61	0,17	-0,11
	Nematodos	0,01	0,14	0,23

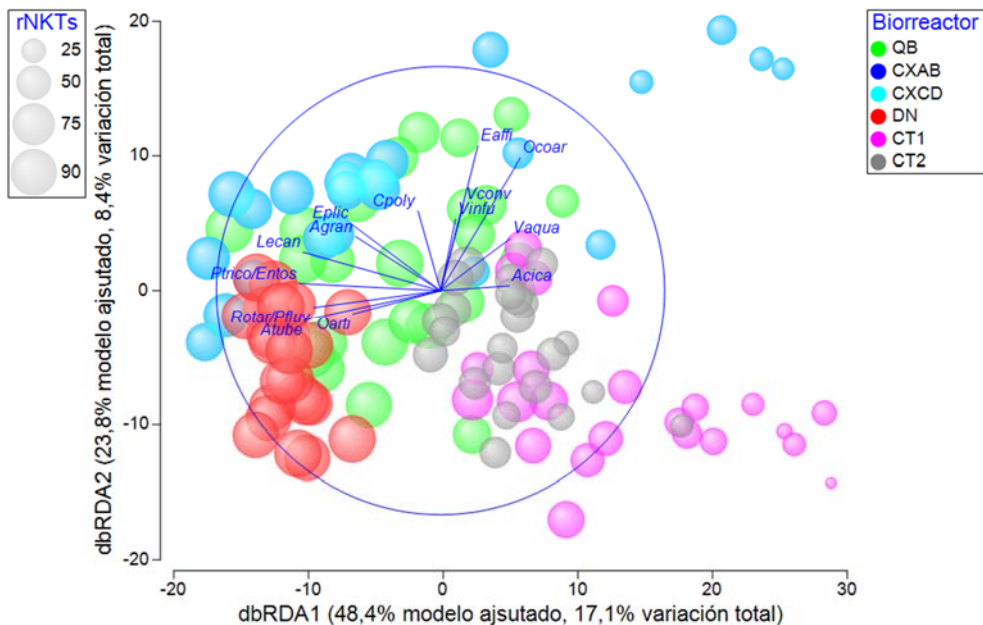


Figura 4.22. Gráfico de burbujas del rNKTs en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre componentes del nitrógeno y densidad de protistas y metazoos de la matriz total. Los vectores superpuestos corresponden a los coeficientes de correlación de Pearson de las variables biológicas mayores de 0,30 y -0,40.

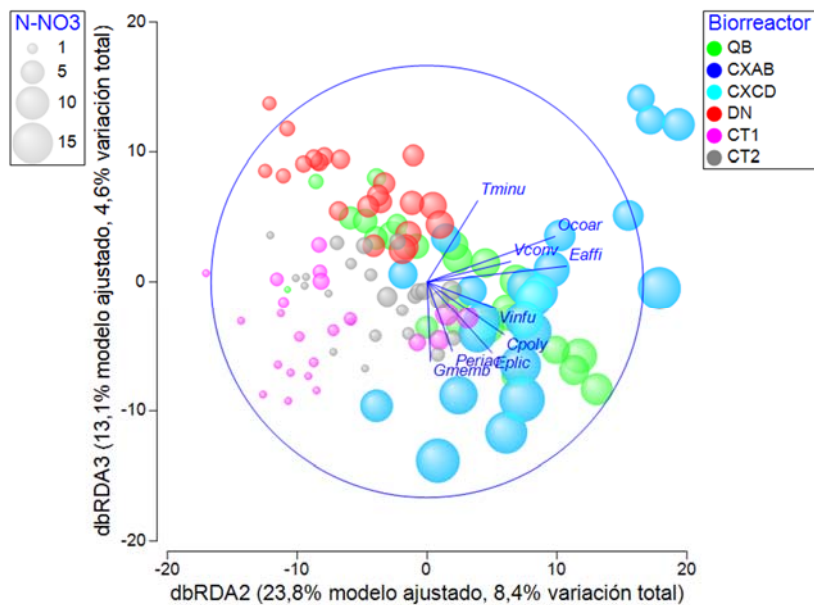


Figura 4.23. Gráfico de burbujas del N-NO_3^- en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre componentes del nitrógeno y densidad de protistas y metazoos de la matriz total. Los vectores superpuestos corresponden a los coeficientes de correlación de Pearson de las variables biológicas mayores de 0,30 y -0,30.

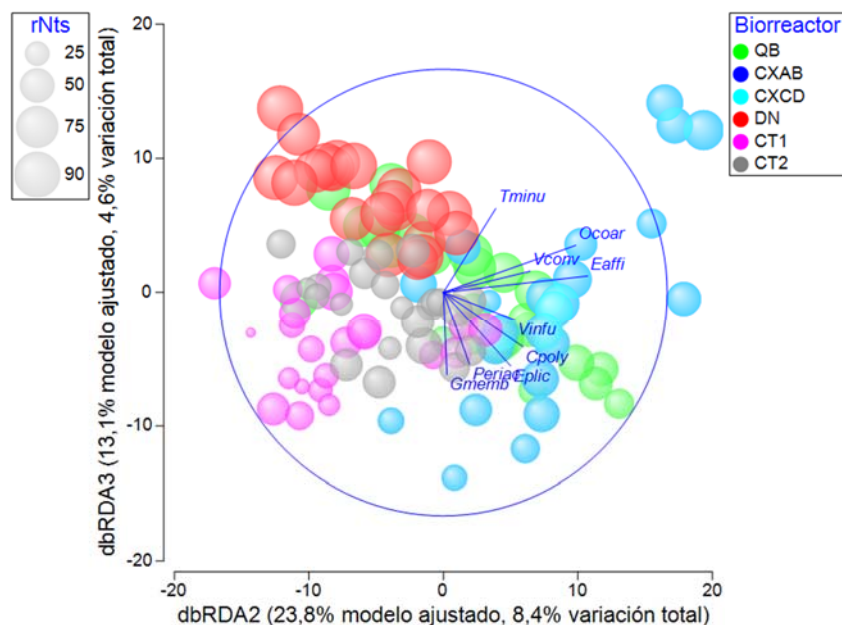


Figura 4.24. Gráfico de burbujas del rNTs en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre componentes del nitrógeno y densidad de protistas y metazoos de la matriz total. Los vectores superpuestos corresponden a los coeficientes de correlación de Pearson de las variables biológicas mayores de 0,30 y -0,30.

Los coeficientes de correlación múltiple parcial de cada componente del nitrógeno calculados en la rutina DISTLM de la matriz total de los grupos indican aquellos que se encuentran representados de forma significativa en los ejes del dbRDA (tabla 4.16). El primer eje se encuentra relacionado positivamente con el rNKTs y negativamente con el %N-NO₂⁻ del efluente. Dicho eje, que explica el 21,9% del total de la variación, define el rendimiento del proceso de nitrificación. El segundo eje, que explica el 5,2% y relacionado negativamente con el rNTs, representa el rendimiento del proceso de nitrificación-desnitrificación. El tercer eje, que explica el 1,72%, se relaciona negativamente con el N-NO₂⁻ y N-NO₃⁻ del efluente.

Los coeficientes de correlación de Pearson de los distintos grupos con cada uno de los ejes del dbRDA han sido calculados para identificar su respuesta debido a la variación del rNKTs, %N-NO₂⁻ y rNTs (tabla 4.16). El grupo de los grandes flagelados, rotíferos y metazoos muestran los coeficientes de correlación positivos más elevados ($r > 0,60$) con el primer eje, mientras que las amebas testáceas, amebas desnudas, amebas, haptóridos, filofaríngeos, suctores y amebas grandes lo hacen con coeficientes de correlación moderados y bajos (entre 0,30 y 0,50). El diagrama de burbujas del dbRDA indica que la abundancia de dichos grupos se asoció a valores del rNKTs por encima del 75% (figura 4.25), así como a valores del %N-NO₂⁻ inferiores al 10%. Contrariamente, el grupo de los hipotricos lo hizo con valores del rNKTs inferiores al 50% y superiores al 10% del %N-NO₂⁻. El grupo de los pequeños flagelados y haptóridos se encuentran relacionados en el segundo eje con valores de rNTs superiores al 50%.

Tabla 4.16. Coeficientes de correlación múltiple parcial de los componentes del nitrógeno y correlaciones de Pearson de los grupos con los ejes del dbRDA en la matriz total.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3
Matriz total	rNKTs	0,796	0,279	-0,032
	rNTs	0,078	-0,712	-0,099
	%N-NO ₂ ⁻	-0,474	0,352	0,068
	N-NO ₂ ⁻	-0,237	-0,414	-0,605
	N-NO ₃ ⁻	0,282	-0,347	-0,608
	Pequeños flagelados	-0,09	-0,30	-0,02
	Grandes flagelados	0,69	-0,07	0,07
	Amebas testáceas	0,42	0,23	-0,08
	Amebas desnudas	0,37	-0,07	0,06
	Amebas	0,42	0,06	-0,07
	Rotíferos	0,69	-0,02	0,07
	Nematodos	-0,04	-0,29	0,01
	Gastrotricos	0,21	0,17	-0,05
	Anélidos	0,16	0,06	0,06
	Metazoos	0,64	-0,12	0,08
	Heterotricos	-0,02	-0,10	-0,16
	Hipotricos	-0,34	0,08	0,16
	Esticotricos	0,06	0,09	0,01
	Haptóridos	0,39	-0,37	-0,15
	Filofaríngeos	0,36	-0,18	0,12
	Suctores	0,45	0,24	-0,02
	Peniculinos	0,001	-0,01	-0,09
	Escuticociliados	0,14	0,08	0,16
	Peritricos	-0,09	-0,23	0,19
	Prorodóntidos	0,34	0,06	0,04

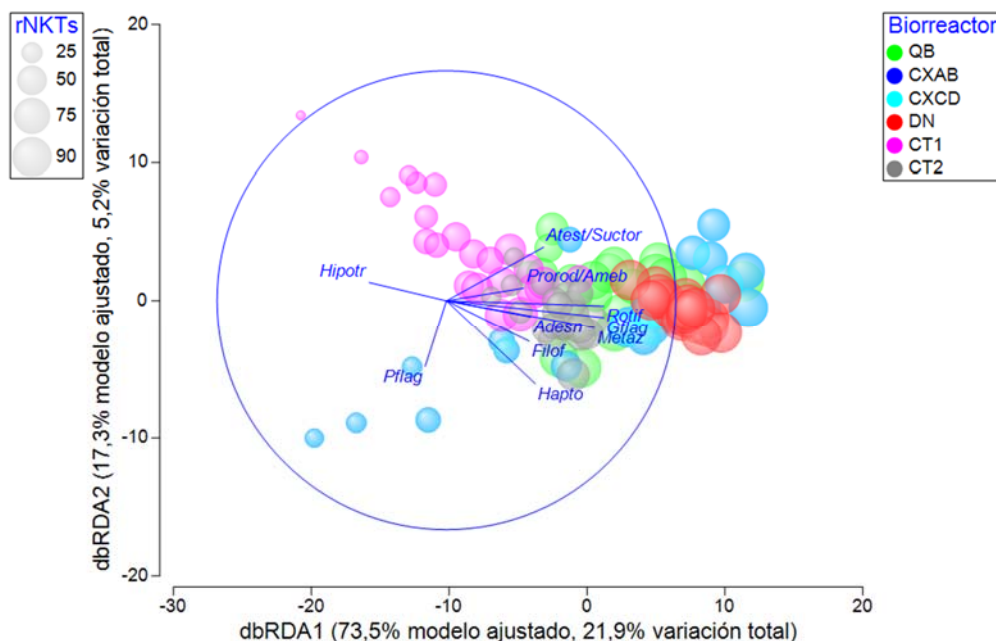


Figura 4.25. Gráfico de burbujas del rNKTs en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre componentes del nitrógeno y densidad de grupos de protistas y metazoos de la matriz total. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson de las variables biológicas mayores de 0,30 y 0,40.

4.2.2 Descripción de los modelos de ordenación basados en el análisis de correspondencias canónico

La longitud del gradiente del primer eje, determinado a través de la rutina DCA, correspondiente a las distintas especies y géneros de protistas y metazoos es de 1,787 SD, mientras que para los grupos es de 0,977. En el caso del estudio de la variación de las especies de protistas y metazoos ha sido elegido el modelo unimodal (CCA), puesto que uno de los objetivos planteados en el presente trabajo es el establecer el *ranking* de su valor bioindicador, en este caso respecto a los componentes del nitrógeno.

El factor de inflación de la varianza (VIF) de los componentes del nitrógeno en el caso del análisis de correspondencias canónico (CCA) ha sido calculado en dos pasos. En el primero han sido calculados los VIF de todas las variables, eliminando posteriormente del modelo las tres variables que presentan valores de inflación más elevados: Nox (80), NT (483) y NKT (380), coincidiendo con las eliminadas en el análisis de colinealidad previo a las rutinas DISTLM y BIO-ENV. En el segundo paso se han calculado los VIF prescindiendo de las variables anteriores, excluyendo posteriormente el rNKT (21), NKTs (21) y rNT (14), siendo estas dos últimas no significativas en la rutina BIO-ENV. El nivel de significación de las variables restantes ha sido calculado de forma manual con la rutina *forward selection*, empleando el test de Montecarlo con 999 permutaciones. El rN-NH₄⁺ ha sido excluido del modelo por presentar un nivel de significación mayor de 0,05 (F=1,379 y p=0,1140). El resto de las variables significativas seleccionadas en el modelo presentan un VIF<10.

A partir del CCA, entre componentes del nitrógeno y protistas y metazoos, han sido extraídos nuevos ejes canónicos. Los dos primeros ejes explican el 17,4% de la variabilidad de su abundancia, siendo el 68,7% de esta explicada por los componentes del nitrógeno (tabla 4.17). La escasa diferencia entre la inercia total de la ordenación y la suma de los valores propios canónicos, así como la elevada correlación entre variables biológicas-componentes del nitrógeno en los dos primeros ejes (0,811 y 0,812), han demostrado que los componentes del nitrógeno han sido factores determinantes en la explicación de la variabilidad de la comunidad de protistas y metazoos. El N-NH₄⁺, %N-NO₂⁻, N-NO₂⁻ y NTs se encuentran correlacionados de forma positiva con el primer eje, mientras que el rNKTs lo hace de forma negativa. Por otro lado, el N-NH₄⁺ se encuentra correlacionado de forma positiva con el segundo eje, mientras que el N-NO₃⁻, rNTs y rNKTs lo hacen de forma negativa. El resultado de la partición de la varianza del CCA (pCCA) muestra que el *ranking* de la varianza, en orden decreciente, explicada de forma individual por cada una de las variables es la siguiente: rNKTs (3,5%)>N-NO₃⁻ (3,4%)>rNTs (2,7%)>N-NH₄⁺ (1,4%)>NTs (1,3%)>%N-NO₂⁻ (1%)>N-NO₂⁻ (0,7%). El primer eje se encontraría definido por el rendimiento del proceso de nitrificación, mientras que el segundo representaría principalmente la concentración del N-NO₃⁻ del efluente.

Tabla 4.17. Resultados del análisis de correspondencias canónico entre los componentes del nitrógeno y protistas y metazoos.

Ejes	1	2	3	4	Inercia total	
Valores propios	0,083	0,044	0,030	0,012	0,731	
Correlaciones v. biológicas-v. ambientales	0,811	0,812	0,734	0,601		
Porcentaje de la varianza explicada						
por las v. biológicas	11,3	17,4	21,4	23,1		
por la relación v. biológicas-v. ambientales	44,8	68,7	84,8	91,3		
Suma de todos los valores propios canónicos					0,185	
Variables ambientales seleccionadas	Correlaciones de Pearson (r)				Test de Montecarlo	
					F	p-valor
N-NH ₄ ⁺	0,6627	0,6565	-0,1549	-0,3123	11,741	0,0010
%N-NO ₂ ⁻	0,4736	0,3687	-0,1846	0,2053	2,263	0,0010
N-NO ₂ ⁻	0,4059	0,3078	-0,2232	-0,3263	1,689	0,0390
N-NO ₃ ⁻	0,0271	-0,8947	-0,4038	0,1046	10,132	0,0010
rNKTs	-0,7171	-0,5090	0,0486	-0,1547	8,718	0,0010
rNTs	-0,3186	-0,5712	0,4916	-0,0484	3,518	0,0010
NTs	0,6857	0,3795	-0,5535	-0,0578	2,819	0,0010

El biplot del CCA de la figura 4.26 representa las muestras de los distintos biorreactores y los componentes del nitrógeno. Cada flecha apunta en la dirección esperada de mayor incremento en el valor del componente considerado, representando el ángulo entre dos flechas el grado de correlación. El ángulo agudo observado entre el N-NH₄⁺, %N-NO₂⁻, N-NO₂⁻ y NTs indica que se encuentran relacionados directamente, representando un gradiente definido por la inestabilidad del proceso de nitrificación. La misma tendencia se observa entre el rNKTs, NTs y N-NO₃⁻ (ángulo agudo), indicando que no existe un gradiente ambiental que defina por separado los rendimientos del proceso de nitrificación y nitrificación-desnitrificación. La proyección perpendicular de los puntos sobre la línea imaginaria que representa un vector aproxima el valor de la variable ambiental en dichos lugares, incrementándose en el sentido de la flecha. De esta forma, las muestras procedentes de CT1 y CT2 contribuyen en el modelo de ordenación con valores elevados del N-NH₄⁺, %N-NO₂⁻, N-NO₂⁻ y NTs (estado de inestabilidad de la nitrificación), mientras que las correspondientes a DN lo hacen con elevados valores de eliminación del nitrógeno. Los biorreactores QB y CX (CXAB y CXCD) contribuyen en el modelo con ambas situaciones.

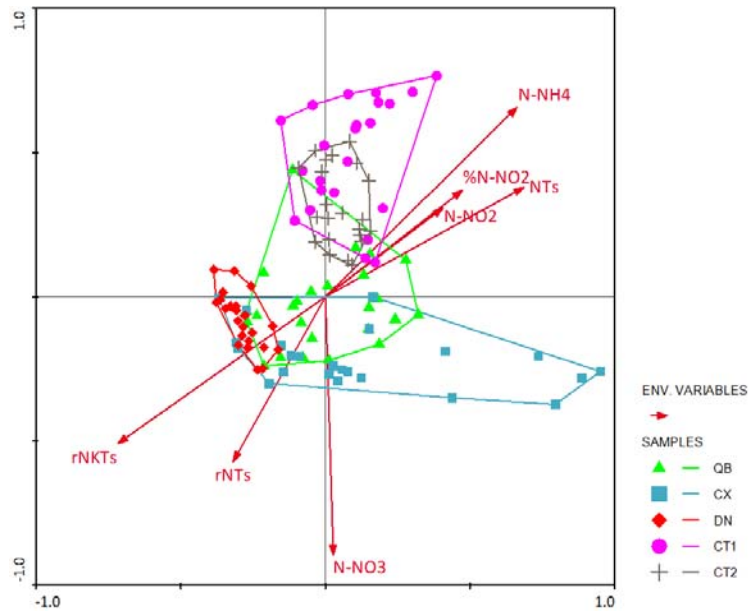


Figura 4.26. Biplot del análisis de correspondencias canónico representando las muestras de los distintos biorreactores con respecto a los componentes del nitrógeno seleccionados.

Debido a que el rendimiento del proceso de nitrificación-desnitrificación no se encuentra definido de forma independiente del rendimiento del proceso de nitrificación, han sido omitidos del modelo final propuesto las variables $rNTs$ y $N-NO_3$, explorando exclusivamente el valor bioindicador de protistas y metazoos respecto al rendimiento del proceso de nitrificación (figura 4.27). Los puntos representados por las distintas especies y géneros de protistas y metazoos pueden también ser proyectados perpendicularmente sobre la línea imaginaria superpuesta al vector que representa a una variable ambiental en particular. Dichas proyecciones aproximan el óptimo de la variable biológica con respecto a la variable ambiental, por lo tanto, las proyecciones que se encuentran más cerca de la punta de la flecha del vector indican que tienen preferencia por valores más altos de dicha variable. De esta forma, ha sido establecido el *ranking* de su valor bioindicador con respecto a los valores de los componentes que representan el rendimiento del proceso de nitrificación (tabla 4.18). Los resultados indican que las variables biológicas más relacionadas con rendimientos óptimos en el proceso de nitrificación son las siguientes: *E. sulcatum*, *P. operculata*, *A. tuberosa* y *E. plicatilis*. Por el contrario, las variables más relacionadas con bajos rendimientos e inestabilidad en el rendimiento del proceso de nitrificación son: *O. coarctata*, *T. infusionum*, *E. affinis*, *V. infusionum*, *V. microstoma* y *V. aquadulcis*.

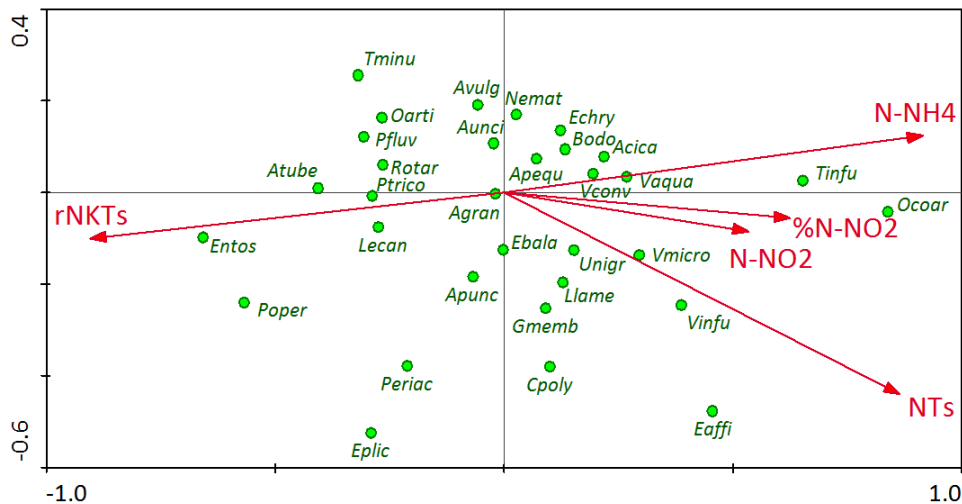


Figura 4.27. Biplot del análisis de correspondencias canónico representando el proceso de nitrificación a través de la relación entre protistas y metazoos y los componentes del nitrógeno.

Tabla 4.18. Ranking (R) de protistas y metazoos respecto a la aproximación del valor óptimo de los componentes del nitrógeno.

rNKTs		-NTs*		NTs		N-NH ₄ ⁺	
R	V. biológicas	R	V. biológicas	R	V. biológicas	R	V. biológicas
1	<i>E. sulcatum</i>	1	<i>E. sulcatum</i>	1	<i>O. coarctata</i>	1	<i>O. coarctata</i>
2	<i>P. operculata</i>	2	<i>P. operculata</i>	2	<i>E. affinis</i>	2	<i>T. infusioenum</i>
3	<i>A. tuberosa</i>	2	<i>T. minuta</i>	3	<i>T. infusioenum</i>	3	<i>E. affinis</i>
4	<i>E. plicatilis</i>	3	<i>A. tuberosa</i>	4	<i>V. infusioenum</i>	4	<i>V. infusioenum</i>
5	<i>T. minuta</i>	4	<i>P. fluviatilis</i>	5	<i>V. microstoma</i>	5	<i>V. microstoma</i>
5	<i>P. fluviatilis</i>	4	<i>O. articulata</i>	6	<i>C. polypinum</i>	5	<i>V. aquadulcis</i>
5	<i>P. trichophorum</i>	5	<i>Rotaria sp.</i>	7	<i>G. membranaceous</i>	6	<i>A. cicada</i>
5	<i>Lecane sp.</i>	5	<i>P. trichophorum</i>	7	<i>L. lamella</i>	6	<i>V. convallaria</i>
5	<i>O. articulata</i>	6	<i>Lecane sp.</i>	7	<i>V. aquadulcis</i>	7	<i>U. nigricans</i>
5	<i>Rotaria sp.</i>	7	<i>A. vulgaris</i>	7	<i>U. nigricans</i>	7	<i>B. saltans</i>
5	<i>Periacineta sp.</i>			8	<i>A. cicada</i>	7	<i>E. chrysemidis</i>
				9	<i>V. convallaria</i>		

* Gradiente negativo

4.3 Influencia de las variables operacionales y fisicoquímicas en la dinámica poblacional de la comunidad de protistas y metazoos

4.3.1 Exploración de la inercia biológica de las variables operacionales

La edad del fango (EF), a pesar de ser fácil de calcular, es una variable sobre la que tiene una gran influencia el régimen de purgas de los fangos en exceso de las instalaciones, que en ocasiones puede ser irregular y variable (figura 4.28). Los biorreactores QB y DN presentaron durante el periodo de estudio una gran variabilidad, siendo frecuentes los días sin purga. Por el contrario, los biorreactores CT1, CT2, CXAB y CXCD mostraron un régimen más regular y constante, con pocos días sin purga. El mayor caudal de purga correspondió a QB, que presentó un mayor caudal y carga contaminante afluente respecto al resto de biorreactores.

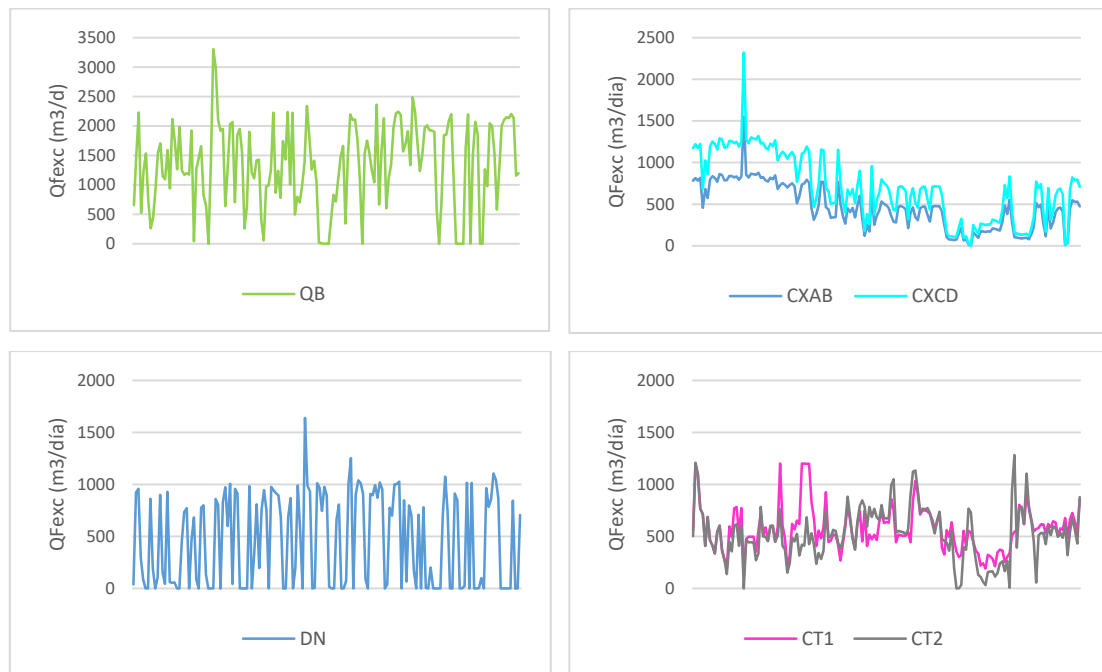


Figura 4.28. Caudal diario de purga de fangos en exceso de los biorreactores.

Para determinar el efecto de la ausencia o la irregularidad de purgas y la inercia biológica de la EF, se han calculado siete variables en base al sumatorio de los siete días (EF1-EF7) anteriores a la toma de muestras del licor mezcla (figura 4.29). La EF1 de los biorreactores QB y DN muestra una elevada desviación estándar y mayor promedio que el resto (EF2-EF7), debido a la elevada variabilidad de purga de fangos en exceso. En el caso de CXAB y CXCD, la EF no muestra diferencias reseñables en valor promedio y desviación estándar (6-8 días). En el caso del CT1 y

CT2, los promedios y desviaciones de las EF son similares (5-10 días), siendo descendente hasta la EF4 en el caso de CT2.

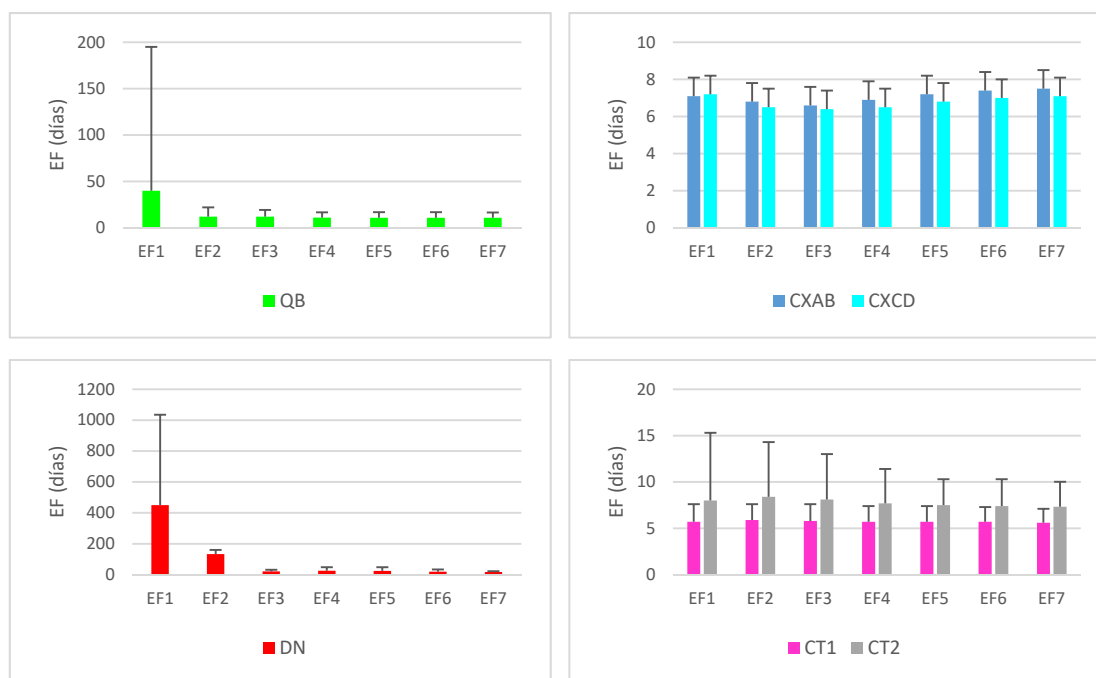


Figura 4.29. Promedio y desviación estándar de la serie EF1-EF7 en los biorreactores.

En el caso de la carga másica (CM), tiempo de retención hidráulico en el reactor (TRHr) y decantador secundario (TRHds), y también con el fin de estudiar su inercia biológica, han sido calculadas diferentes variables en función del promedio respecto a los días anteriores a la toma de muestras del licor mezcla. La matriz distancia calculada a partir de la distancia euclídea de cada una de las nuevas variables (EF, CM (DBO₅), CM (DQOs), TRHr y TRHds) ha sido relacionada con la matriz distancia biológica, calculada a partir de la distancia de Bray-Curtis de cada uno de los biorreactores, empleando la rutina BIO-ENV. La estrategia en dicha rutina ha sido la selección de las siete mejores combinaciones de variables, en el caso de la EF, y cuatro combinaciones, en el caso de la CM y TRH, seleccionando como criterio la elección de una única variable a partir del método de correlación de Spearman (tabla 4.19). Los resultados han permitido conocer las diferencias en la inercia biológica entre biorreactores. En el caso de la EF, la variable EF7 en QB y CX se muestra como la más adecuada, mientras que en CT y DN parecen ser las EF2 y EF3, respectivamente. Las variables con los coeficientes de correlación más elevados (marcadas en negrita) han sido consideradas como las más adecuadas para su inclusión en los tratamientos estadísticos exploratorios y de interpretación ambiental. Los coeficientes de correlación más bajos de la EF corresponden a los biorreactores QB y CT1.

La CM, expresada en forma de DBO₅ y DQOs (soluble), presenta coeficientes de correlación moderados respecto a la matriz biológica en los biorreactores QB y DN, mientras que en el resto de biorreactores presentan menores coeficientes de correlación. Por otro lado, se observan diferencias significativas entre los valores promedio de la CM (expresada como DQOs) y CM* (expresada como DQOs) en algunos de los biorreactores; que en CXAB, CXCD, DN y CT1 no son coincidentes con los mayores coeficientes de correlación, mientras que en QB (CM3 y CM3*) y CT2 (CM2b y CM2b*) se obtienen resultados coincidentes. En el caso del TRHr, predomina en todos los casos una baja correlación, a excepción del biorreactor CT1, que muestra una correlación moderada. De forma similar al TRHr, la variable TRHds presenta en general una baja correlación, observándose los coeficientes más elevados en el caso del biorreactor DN.

Tabla 4.19. Coeficientes de correlación de Spearman de la rutina BIO-ENV de la serie EF1-EF7 y variables promedio de la CM, TRHr y TRHds, relacionados con la abundancia de protistas y metazoos.

	QB	CXAB	CXCD	DN	CT1	CT2
EF1	<0,01	0,37	0,23	0,02	<0,01	0,16
EF2	<0,01	0,39	0,33	0,08	0,06	0,30
EF3	<0,01	0,35	0,32	0,19	0,01	0,29
EF4	<0,01	0,37	0,29	0,13	<0,01	0,27
EF5	<0,01	0,38	0,25	0,13	<0,01	0,11
EF6	<0,01	0,38	0,30	0,06	<0,01	0,06
EF7	0,02	0,39	0,38	0,09	<0,01	0,08
CM1	0,23	0,09	0,14	0,28	0,04	0,05
CM2a	0,20	0,06	0,15	0,07	0,07	<0,01
CM2b	0,18	0,02	0,11	<0,01	0,04	0,08
CM3	0,24	0,10	0,19	0,03	0,06	0,02
CM1*	0,19	0,08	0,04	0,21	0,10	0,03
CM2*	0,17	<0,01	0,09	0,02	0,08	<0,01
CM2b*	0,19	<0,01	<0,01	0,31	0,03	0,07
CM3*	0,20	<0,01	<0,01	0,16	0,06	<0,01
TRHr1	<0,01	0,01	0,12	0,02	0,32	0,10
TRHr2a	<0,01	0,02	0,08	<0,01	0,36	0,04
TRHr2b	0,01	<0,01	0,13	<0,01	0,28	0,09
TRHr3	<0,01	<0,01	0,06	<0,01	0,30	0,09
TRHds1	0,13	<0,01	0,02	0,01	0,39	0,02
TRHds2a	0,12	0,03	0,03	<0,01	0,39	0,05
TRHds2b	0,09	0,06	0,11	<0,01	0,34	0,08
TRHds3	0,12	0,05	0,03	<0,01	0,40	0,12

*Calculada con la DQO soluble

Los valores promedio más elevados de la EF corresponden a DN (22 días), mostrando la mayor dispersión de datos en el rango intercuartílico (figura 4.30), seguido de QB (11 días), mostrando un valor de la mediana muy cercano al primer cuartil, y por lo tanto, escasa dispersión de los datos (abundantes valores entre 7 y 8 días). Los biorreactores de la EDAR CX (CXAB y CXCD) presentan una distribución similar de la EF (7,5 y 7,1 días), mientras que los referentes a la EDAR CT (CT1 y CT2) son distintos (5,9 y 8,4 días). Los valores anómalos no se han excluido de las matrices, puesto que se considera que aportan información biológica sobre los periodos con bajas tasas de purga.

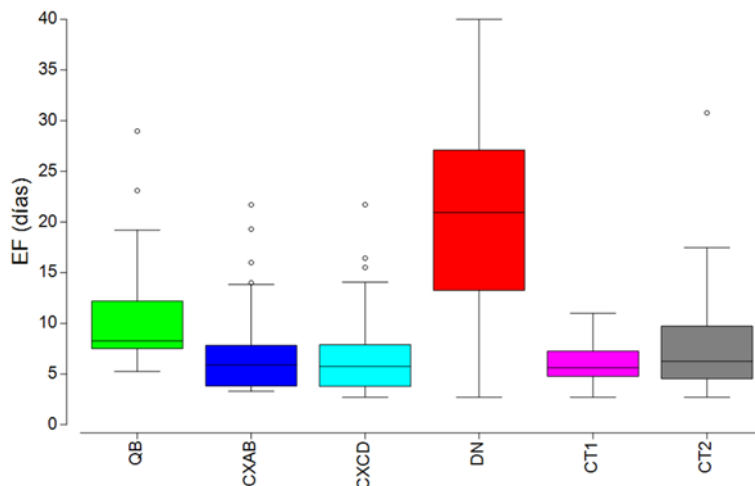


Figura 4.30. Diagrama de cajas y bigotes de la EF en los biorreactores.

Los valores promedio más elevados de la CM, así como su variabilidad, corresponden a los biorreactores CXAB y CXCD (0,30 y 0,31 kg DBO₅/SSVLM.d) (figura 4.31). Los biorreactores CT1, CT2 y QB presentan menor variabilidad de la CM respecto a los anteriores, así como menores promedios (0,28, 0,25 y 0,20 kg DBO₅/SSVLM.d, respectivamente). Por último, DN se caracteriza por la escasa variabilidad de la CM y el bajo valor promedio (0,07 kg DBO₅/SSVLM.d).

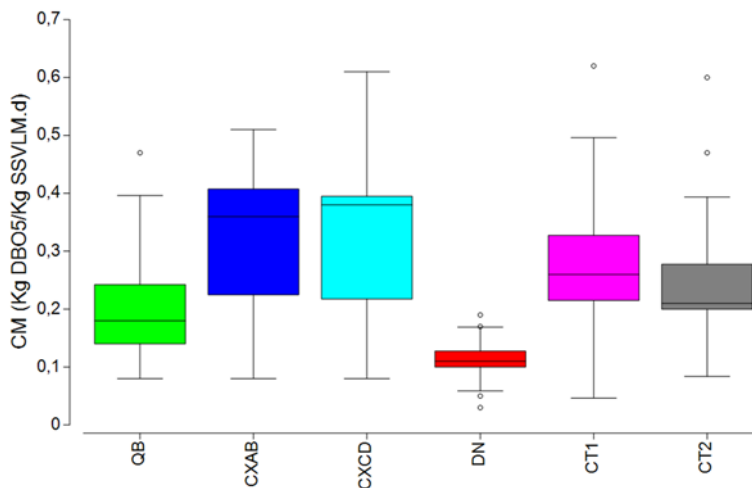


Figura 4.31. Diagrama de cajas y bigotes de la CM en los biorreactores.

El aspecto más destacable del TRHr es sin duda su escasa variabilidad en todos los biorreactores, especialmente en CXAB, CXCD, CT1 y CT2, cuyos valores promedio se encuentran entre 5 y 7 horas (figura 4.32). La mayor variabilidad del TRHr fue observada en DN y QB, con valores promedio de 15 y 18 horas, respectivamente.

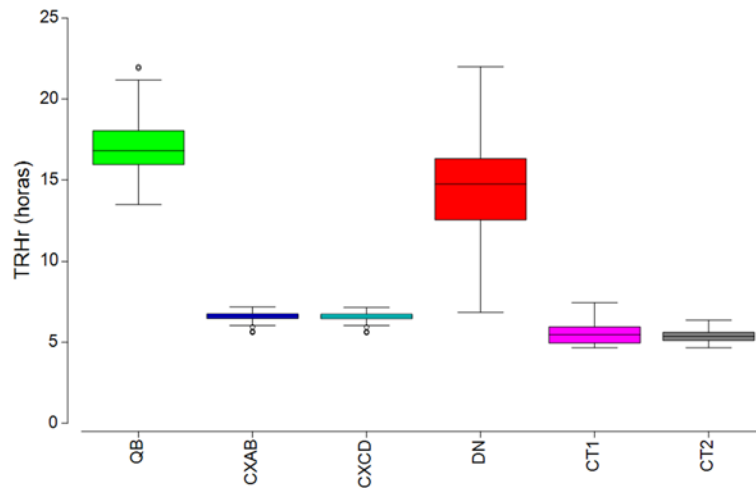


Figura 4.32. Diagrama de cajas y bigotes del TRHr en los biorreactores.

En el caso del TRHds, la variabilidad es mayor que para el TRHr, siendo especialmente significativa en el biorreactor QB (figura 4.33). Los valores promedio más elevados corresponden a CXAB y CXCD (9,2 y 8 horas, respectivamente), mientras que los más bajos corresponden a CT1 y CT2 (4,9 y 5,3 horas, respectivamente).

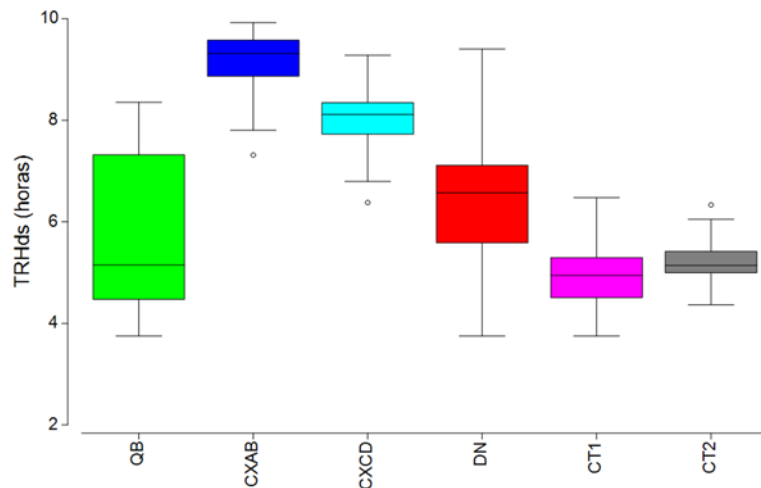


Figura 4.33. Diagrama de cajas y bigotes del TRHds en los biorreactores.

Debido a que los biorreactores de las EDAR estudiadas presentan distinto diseño, fueron explorados en la rutina BIO-ENV diferentes posiciones del medidor en línea del oxígeno disuelto (OD) en el tanque de aireación (P1, P2 y P3), considerando además dos variables (X1 y X3) (tabla 4.20 y figura 4.34). La variable X1 corresponde al valor del OD del día anterior al muestreo del licor mezcla, mientras que X3 hace referencia al valor promedio de los tres días anteriores. La posición P1 se sitúa al inicio del reactor aireado, P2 en la zona central y P3 al final del reactor. En los biorreactores QB, CXAB y CXCD no se dispone de datos de OD de los medidores en línea de las posiciones P1 y P2, mientras que en CT1 y CT2 se dispone de las tres posiciones. En el caso de la EDAR DN, las tres posiciones corresponden a tres biorreactores dispuestos en serie. En la tabla 4.20 aparecen marcadas en negrita las variables correspondientes a los mayores coeficientes de correlación de Spearman obtenidos a partir de la rutina BIO-ENV, y por lo tanto, consideradas las más adecuadas para los tratamientos estadísticos exploratorios y de interpretación ambiental. En el caso de QB, CXAB y CXCD corresponden a los valores de OD del día anterior al muestreo y en la P3, mientras que en DN corresponden al promedio de los tres días anteriores al muestreo y en la P1. Por último, la correlación más significativa del OD en CT1 y CT2 corresponde al promedio de los tres días anteriores, siendo el ODb en P1, ODm en P2 y ODa en P3.

Tabla 4.20. Coeficientes de correlación de Spearman de la rutina BIO-ENV de las variables promedio y posición del OD, relacionadas con la abundancia de protistas y metazoos.

Posición	Variable	QB	CXAB	CXCD	DN	CT1	CT2
P1	ODb1	-	-	-	0,07	0,19	0,44
	ODm1	-	-	-	0,13	<0,01	0,16
	ODa1	-	-	-	<0,01	0,10	0,12
P2	ODb1	-	-	-	0,18	<0,01	0,04
	ODm1	-	-	-	0,16	0,15	0,32
	ODa1	-	-	-	0,05	<0,01	0,03
P3	ODb1	0,11	0,08	<0,01	0,07	0,19	<0,01
	ODm1	0,21	0,24	0,07	0,13	<0,01	0,15
	ODa1	0,18	0,23	0,12	<0,01	0,10	0,06
P1	ODb3	-	-	-	0,19	0,19	0,31
	ODm3	-	-	-	0,24	<0,01	0,14
	ODa3	-	-	-	<0,01	0,06	0,05
P2	ODb3	-	-	-	0,28	<0,01	0,03
	ODm3	-	-	-	0,08	0,20	0,29
	ODa3	-	-	-	<0,01	0,06	0,03
P3	ODb3	0,08	0,04	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	ODm3	0,27	0,16	0,05	0,01	0,37	0,27
	ODa3	0,21	0,04	0,04	<0,01	0,27	0,20



Figura 4.34. Diseño de los biorreactores. (a) EDAR QB. (b) EDAR CX. (c) EDAR DN. (d) EDAR CT.

4.3.2 Búsqueda de modelos de interpretación ambiental

Los resultados de la media, desviación estándar y rango de las variables ambientales utilizadas para la búsqueda de modelos de interpretación ambiental que mejor explican la dinámica poblacional de protistas y metazoos se encuentran incluidos en las tablas 8.5, 8.6 y 8.7 del anexo. Debido a la distinta naturaleza y tipología de las variables ambientales, estas han sido distribuidas en tres categorías: variables operacionales (OPE), variables fisicoquímicas de licor mezcla (FQLM) y del afluente (FQAF) al reactor (tabla 4.21). Las variables OPE, que suman un total de 11, corresponden a variables que pueden ser modificadas por el responsable de proceso durante la explotación de la EDAR. En las variables FQLM, que suman un total de 9, influyen las variables operacionales, las condiciones meteorológicas y las características fisicoquímicas del afluente al reactor. Las características de las variables FQAF, que suman un total de 12, se encuentran influenciadas por las condiciones meteorológicas, la cantidad y costumbres de la población, las características fisicoquímicas del agua de uso y consumo doméstico, así como de la tipología de las industrias conectadas a la red de saneamiento.

Los resultados de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis indican, desde una perspectiva univariante, que la mayoría de las variables ambientales presentaron diferencias significativas respecto al factor biorreactor, a excepción de las siguientes: R.rec, DQOLM, IVF30, IVF5 y CO₃ (tabla 4.21). Esta última presentó diferencias significativas entre biorreactores en los cuales se suministró ozono (CT1 y CT2). Contrariamente, la mayoría de variables ambientales no presentaron diferencias significativas respecto al factor estacional, a excepción de las variables FQLM (menos el pHLM y PTLM), EF, CMDQOs, CP-PO₄³⁻ y DBO₅/NT.

Tabla 4.21. Prueba de Kruskal-Wallis de las variables ambientales, según el factor biorreactor y estacional.

		Biorreactor		Estacional	
		H	p	H	p
OPE	EF	58,02	0,0001*	11,69	0,0085*
	CM	65,49	0,0001*	6,73	0,0810
	CMDQOs	55,39	0,0001*	10,69	0,0135*
	TRHr	118,76	0,0001*	1,20	0,7539
	TRHds	99,17	0,0001*	3,69	0,2966
	SSLM	103,59	0,0001*	0,90	0,8260
	R.rec	8,80	0,1173	2,19	0,5341
	ODb	99,77	0,0001*	0,16	0,9841
	ODm	76,29	0,0001*	6,12	0,1061
	ODa	101,37	0,0001*	4,04	0,2568
FQLM	CO ₃ (1)	2,51	0,1130	6,29	0,0982
	pHLM	37,68	0,0001*	2,02	0,5690
	CondLM	74,71	0,0001*	8,50	0,0366*
	T _r	12,48	0,0288*	76,50	0,0001*
	%SSVLM	93,46	0,0001*	8,04	0,0451*
	IVF5	7,54	0,1833	29,54	0,0001*
	IVF30	3,85	0,5714	32,73	0,0001*
	NTLM	69,03	0,0001*	10,34	0,0159*
	PTLM	104,30	0,0001*	0,95	0,8134
	DQLM	8,44	0,1336	16,23	0,0010*
FQAF	%DQOs	56,06	0,0001*	3,40	0,3346
	DQO/DBO ₅	29,25	0,0001*	2,75	0,4322
	CNT	77,07	0,0001*	2,42	0,4898
	CN-NH ₄ ⁺	56,51	0,0001*	4,77	0,1896
	CPT	89,75	0,0001*	5,72	0,1259
	CP-PO ₄ ³⁻	82,40	0,0001*	9,89	0,0195*
	CCarb	67,02	0,0001*	1,42	0,7021
	CProt	68,86	0,0001*	5,00	0,1715
	CAG	55,94	0,0001*	5,65	0,1298
	CAGV	37,20	0,0001*	2,50	0,4755
DBO ₅ /NT	30,34	0,0001*	8,80	0,0321*	
DBO ₅ /PT	100,48	0,0001*	1,21	0,7512	

*p<0,05; (1) CT1 y CT2

La prueba de Kolmogorov-Smirnov, aplicada para el contraste de hipótesis de normalidad del conjunto de datos, indica que las variables ambientales no presentan una distribución normal. Por otro lado, los resultados de los histogramas de frecuencia y gráfico múltiple de dispersión de puntos indican una falta de simetría del conjunto de los datos. Por ello, todas las variables se han transformado con la función Log (X+1), donde X representa la variable

ambiental. Posteriormente, dichas variables han sido normalizadas (rutina de estandarización en PRIMER 7.0) para homogenizar aquellas con diferentes unidades de medición.

El nMDS y la superposición del análisis clúster a partir de las variables ambientales, según el factor biorreactor, indica una clara separación de las muestras de los distintos biorreactores (figura 4.35). En la figura se muestra básicamente cuatro grandes agrupaciones bien definidas, según el valor de 7,9 de la distancia euclídea, observándose una clara separación de las muestras correspondientes a DN, QB, CT y CX. Contrariamente, en el caso de los biorreactores CT1-CT2 y CXAB-CXCD no se observa una clara separación de las muestras.

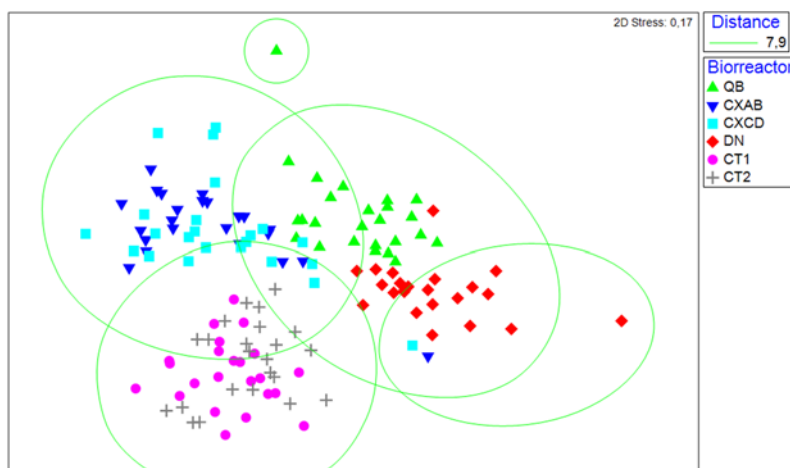


Figura 4.35. nMDS a partir de las variables ambientales, según el factor biorreactor.

Los resultados del nMDS respecto al factor estacional no muestran una clara separación entre los muestreos, indicando que dicho factor parece no influir sobre las variables ambientales, lo cual concuerda con los resultados encontrados en la prueba de Kruskal-Wallis (figura 4.36).

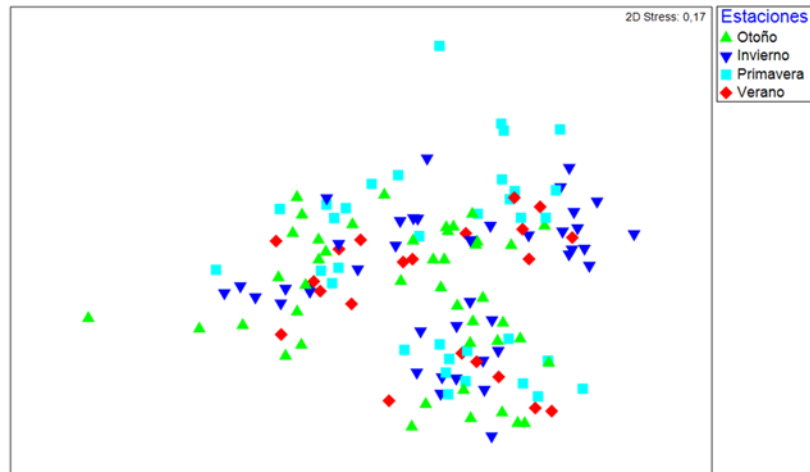


Figura 4.36. nMDS a partir de las variables ambientales, según el factor estacional.

Las rutinas ANOSIM y PERMANOVA han permitido el análisis de las distancias y el contraste de hipótesis de las diferencias significativas a partir de los factores seleccionados (biorreactor y estacional), respectivamente (tabla 4.22). Los resultados del ANOSIM cruzado indican una excelente separación de los biorreactores a lo largo de las estaciones ($R > 0,75$). Los únicos biorreactores que no presentan una separación significativa son los siguientes: CT1-CT2 ($R = 0,081$) y CXAB-CXCD ($R = 0,010$). Además, ambos factores se han explorado individualmente a través de la rutina PERMANOVA de 1 vía para revelar si existen diferencias entre biorreactores y estaciones del año, a partir de las variables ambientales. Los resultados de la rutina PERMANOVA, a partir del factor biorreactor (Bi), indican que existen diferencias significativas entre pares de biorreactores, a excepción de CT1-CT2. Los biorreactores CXAB-CXCD muestran una separación menos significativa que el resto, así como un valor más bajo del estadístico pseudo-F (1,2792). Los resultados de la rutina PERMANOVA, a partir del factor estacional (Es), indican de forma general diferencias menos significativas que las encontradas para el factor biorreactor, siendo las más significativas las correspondientes a otoño-primavera y verano-invierno. En el caso de otoño-verano no se encontraron diferencias significativas.

Tabla 4.22. ANOSIM cruzado (biorreactor x estacional), PERMANOVA (biorreactor) y PERMANOVA (estacional) a partir de las variables ambientales.

	ANOSIM cruzado		PERMANOVA (Bi)		PERMANOVA (Es)	
	R	Significancia (%)	Pseudo-F	p-valor	Pseudo-F	p-valor
Biorreactor	-	-	23,669	0,001*	-	-
Estacional	-	-	-	-	3,0959	0,001*
Biorreactor x Estacional	0,787	0,01*	-	-	-	-
QB, CXAB	0,948	0,01*	5,5577	0,001*	-	-
QB, CXCD	0,891	0,01*	4,6172	0,001*	-	-
QB, DN	0,751	0,01*	4,3871	0,001*	-	-
QB, CT1	0,981	0,01*	5,7700	0,001*	-	-
QB, CT2	0,884	0,01*	5,0943	0,001*	-	-
CXAB, CXCD	0,010	43	1,5129	0,04*	-	-
CXAB, DN	0,947	0,01*	6,4473	0,001*	-	-
CXAB, CT1	0,924	0,01*	4,9617	0,001*	-	-
CXAB, CT2	0,903	0,01*	4,4692	0,001*	-	-
CXCD, DN	0,918	0,01*	5,8028	0,001*	-	-
CXCD, CT1	0,886	0,01*	4,3341	0,001*	-	-
CXCD, CT2	0,831	0,01*	3,8423	0,001*	-	-
DN, CT1	0,994	0,01*	6,4468	0,001*	-	-
DN, CT2	0,945	0,01*	5,6402	0,001*	-	-
CT1, CT2	0,081	9	1,2792	0,073	-	-
Otoño, Invierno	-	-	-	-	1,7146	0,011*
Otoño, primavera	-	-	-	-	1,9959	0,003*
Otoño, verano	-	-	-	-	1,3700	0,093
Invierno, primavera	-	-	-	-	1,6956	0,017*
Invierno, verano	-	-	-	-	1,9797	0,003*
Primavera, verano	-	-	-	-	1,6895	0,017*

Debido a las aparentes discrepancias encontradas entre el nMDS, según el factor estacional (figura 4.36), y los resultados de la rutina PERMANOVA (tabla 4.22), se ha realizado el CAP. Los resultados han permitido encontrar los ejes que mejor discriminan grupos de objetos, en este caso en función del factor estacional, siendo significativas las diferencias entre muestras ($t_r=1,09$; $P=0,001$; 999 permutaciones). Los ejes del PCoA ortonormales seleccionados ($m=15$) describen el 92,4% de la variación total de la nube de puntos descritos por la matriz distancia euclídea, con el 62,9% de asignaciones correctas. Los dos primeros ejes canónicos resultantes del CAP ($\delta^2=0,61$ y $0,36$, respectivamente) han permitido separar grupos de muestras respecto al factor estacional, con una cierta superposición (figura 4.37). Por otro lado, se han superpuesto los vectores de correlación de Pearson de las variables ambientales con los ejes canónicos ($r>0,3$), relacionándose el incremento de la T^a_r y el IVF ($r>0,5$) con las estaciones de verano y primavera, respectivamente, siendo por tanto las variables que más contribuyen a la discriminación entre grupos. Los resultados de la validación cruzada muestran un elevado porcentaje de asignación de las muestras referentes a invierno y verano, y bajo en el caso de otoño (tabla 4.23). El error de mala clasificación de la validación cruzada es del 37,14%.

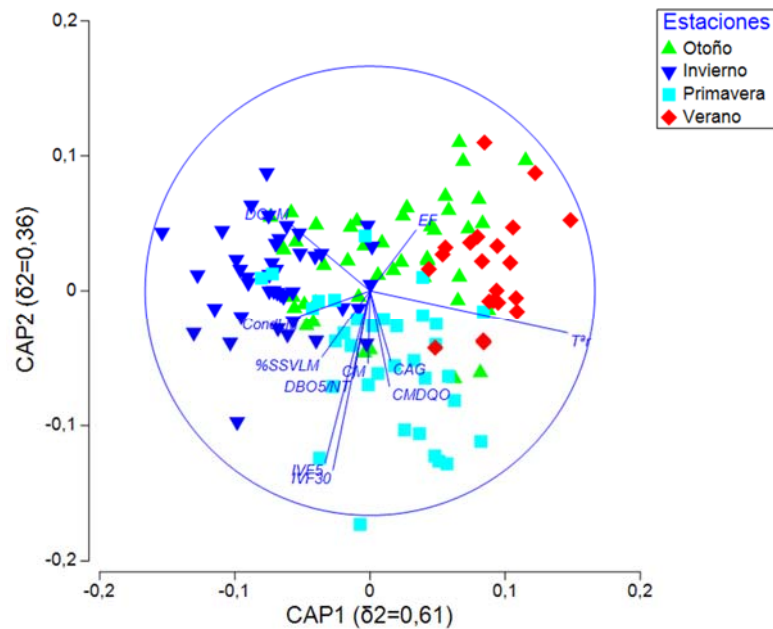


Figura 4.37. CAP a partir de las variables ambientales, según el factor estacional. Los vectores representan la correlación de las variables ambientales ($r > 0,3$) con los ejes canónicos. δ^2 = el cuadrado de la correlación canónica.

Tabla 4.23. Resultados de la validación cruzada de la rutina CAP a partir de las variables ambientales, según el factor estacional.

Grupo original	Otoño	Invierno	Primavera	Verano	Total	% asignación
Otoño	18	13	4	9	44	41
Invierno	6	32	3	0	41	78
Primavera	4	6	22	2	34	65
Verano	3	0	2	16	21	76

A pesar de la evidente separación entre biorreactores a partir de las variables ambientales, demostrada en el nMDS y las rutinas ANOSIM y PERMANOVA, se ha utilizado el CAP para determinar aquellas variables que más han contribuido a la discriminación entre grupos. Los resultados muestran diferencias significativas según el factor biorreactor ($tr=3,64$; $P=0,001$; 999 permutaciones). Los ejes del PCoA ortonormales seleccionados ($m=25$) describen el 99,0% de la variación total de la nube de puntos descritos por la matriz distancia euclídea, con el 89,3% de asignaciones correctas. Los dos primeros ejes canónicos resultantes del CAP ($\delta^2=0,98$ y $0,96$, respectivamente) han permitido separar, con una elevada correlación canónica, grupos de muestras respecto al factor biorreactor (figura 4.38). Por otro lado, se han superpuesto los vectores de correlación de Pearson de las variables ambientales con los ejes canónicos ($r > 0,5$), correlacionándose un elevado número de variables con dichos ejes, y por lo tanto, contribuyendo a la discriminación entre grupos. Los valores elevados del TRHds, %SSVLM y NTLM contribuyen

principalmente a la discriminación de CX, mientras que la relación DBO₅/PT y el TRHr lo hacen para QB. Por otro lado, la CO₃ y el PTLM contribuyen a la discriminación de CT, mientras que la EF lo hace para DN. Los resultados de la validación cruzada muestran un excelente porcentaje de asignación de las distintas variables en todos los biorreactores, destacando el 100% de asignación de las muestras en DN (tabla 4.24). El error de mala clasificación de la validación cruzada es muy bajo (10,71%).

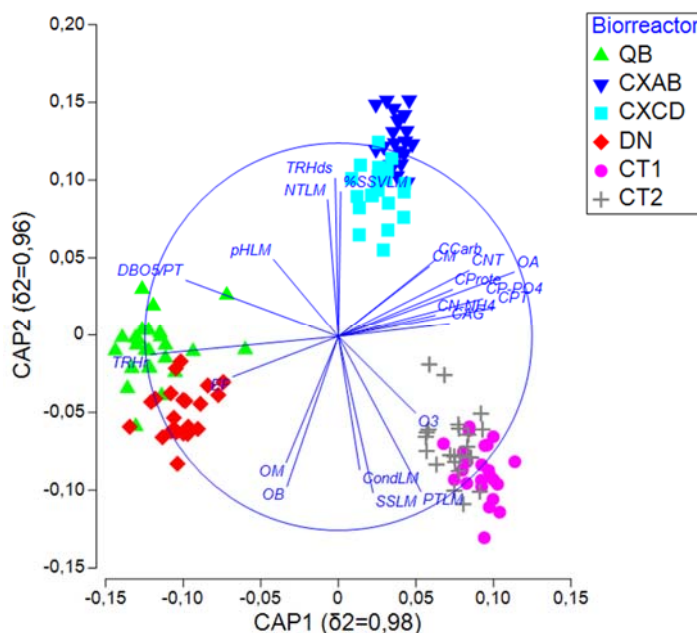


Figura 4.38. CAP a partir de las variables ambientales, según el factor biorreactor. Los vectores representan la correlación de las variables ambientales ($r > 0,5$) con los ejes canónicos. $\delta^2 =$ el cuadrado de la correlación canónica.

Tabla 4.24. Resultados de la validación cruzada de la rutina CAP a partir de las variables ambientales, según el factor biorreactor.

Grupo original	QB	CXAB	CXCD	DN	CT1	CT2	Total	% asignación
QB	24	0	0	1	0	0	25	96
CXAB	0	21	2	0	0	0	23	91
CXCD	0	4	19	0	0	0	23	83
DN	0	0	0	23	0	0	23	100
CT1	0	0	0	0	18	5	23	78
CT2	0	0	0	0	3	20	23	87

El resultado del análisis de componentes principales (PCA) de la matriz total ha permitido extraer nuevos ejes de variación, resumiendo el conjunto de variables ambientales (tabla 4.25). Los mayores porcentajes de variación individual explicada por cada uno de los ejes extraídos corresponden a los dos primeros (30,8 y 18,2%), acumulando

un porcentaje de variación moderado-bajo (49%). Las contribuciones de las variables ambientales a los distintos ejes extraídos son en general bajas. En el primer eje se encuentra representado el mayor porcentaje de la variabilidad de las variables OPE y FQAF, mientras que en los ejes 2-7 se encuentra principalmente la correspondiente a las variables FQLM.

Tabla 4.25. Resultados del PCA de la matriz total del conjunto de biorreactores a partir de las variables ambientales.

Ejes		1	2	3	4	5	6	7
Valores propios		9,85	5,82	3,11	1,77	1,55	1,27	1,16
% variación		30,8	18,2	9,7	5,5	4,9	4,0	3,6
% var. acumulada		30,8	49,0	58,7	64,2	69,0	73,0	76,6
OPE.	EF	0,259	-0,008	0,078	-0,023	0,035	-0,089	0,052
	CM	-0,254	-0,094	-0,087	-0,112	-0,113	0,024	-0,064
	CMDQOs	-0,216	-0,059	-0,222	-0,093	-0,098	-0,065	0,138
	TRHr	0,249	0,135	-0,171	0,007	-0,114	0,111	-0,197
	TRHds	-0,074	0,311	0,212	0,123	-0,032	0,061	0,004
	SSLM	0,090	-0,349	-0,018	0,104	0,126	0,148	0,092
	R.rec	0,083	0,015	0,008	0,064	-0,303	-0,644	-0,161
	ODb	0,242	0,076	-0,147	0,042	-0,108	0,162	-0,180
	ODm	0,099	-0,200	-0,297	-0,020	0,037	0,075	-0,228
	ODa	-0,161	-0,044	0,361	0,145	0,060	-0,111	0,106
FQLM	CO ₃	-0,055	-0,228	-0,106	0,190	0,046	0,121	0,454
	pHLM	0,057	0,225	-0,026	-0,160	-0,028	0,127	0,247
	CondLM	-0,002	-0,251	-0,128	0,302	0,015	0,267	-0,068
	T ^{ar}	-0,036	-0,061	-0,098	-0,474	0,328	-0,243	-0,206
	%SSVLM	-0,130	0,311	-0,110	0,035	0,097	0,177	0,165
	IVF5	-0,052	0,164	-0,260	0,427	0,302	-0,213	-0,106
	IVF30	-0,047	0,145	-0,260	0,425	0,342	-0,212	-0,111
	NTLM	-0,104	0,312	-0,007	0,136	-0,162	0,090	0,083
	PTLM	-0,037	-0,389	0,002	0,016	-0,106	-0,066	-0,133
	DQLM	0,011	-0,094	-0,012	0,320	-0,571	-0,055	0,001
FQAF	%DQOs	0,105	-0,114	-0,281	-0,040	-0,007	-0,217	0,524
	DQO/DBO ₅	-0,136	-0,047	0,237	0,127	0,041	0,271	-0,323
	CNT	-0,299	0,028	0,032	0,007	-0,086	-0,089	-0,012
	CN-NH ₄	-0,253	-0,029	-0,186	-0,116	-0,063	0,055	-0,002
	CPT	-0,301	-0,074	0,048	0,006	-0,025	0,013	-0,087
	CP-PO ₄ ³⁻	-0,305	-0,042	-0,032	-0,001	-0,063	0,025	-0,032
	CCarb	-0,259	0,080	-0,053	0,004	-0,158	-0,117	0,032
	CProt	-0,281	0,015	-0,159	-0,094	0,049	0,069	-0,020
	CAG	-0,233	-0,053	-0,132	0,017	0,101	-0,044	-0,058
	CAGV	-0,096	-0,145	-0,234	-0,087	-0,217	0,036	-0,083
DBO ₅ /NT	0,022	0,096	-0,353	-0,105	-0,144	0,194	-0,128	
DBO ₅ /PT	0,161	-0,261	-0,196	-0,061	-0,149	0,032	0,006	

Para encontrar la combinación de variables ambientales que mejor explica el conjunto de datos de la matriz distancia biológica se ha utilizado la rutina BVSTEP, empleando el método de correlación de rangos de Spearman y el criterio $\rho > 0,95$ y $\Delta \rho < 0,001$. La estrategia exploratoria a seguir ha sido desarrollada en dos pasos. El objetivo del

primero es comparar las variables ambientales que han sido seleccionadas por BVSTEP, en función de su tipología (OPE, FQLM y FQAF), entre cada uno de los biorreactores y la matriz total (tabla 4.26). En el segundo caso, el objetivo es explorar la selección de variables y sus coeficientes de correlación como la comparación de estas entre los biorreactores y la matriz total (tabla 4.27), sin tener en cuenta la tipología de dichas variables. El efecto de la multicolinealidad ha sido evaluado a través del gráfico de dispersión de puntos, eliminando una variable de aquellos pares cuyos coeficientes de correlación de Spearman fueron superiores a 0,95 (marcadas con el símbolo >).

Algunas de las variables ambientales no han sido seleccionadas por la rutina BVSTEP, y por lo tanto, no contribuyen de forma significativa a explicar la variabilidad de la población de protistas y metazoos (tabla 4.26). Entre las variables OPE que no han sido seleccionadas se encuentran los SSLM, la R.rec y el ODb y ODa, entre las FQLM se encuentra la DQOLM, y entre las FQAF se encuentran la CN-NH₄⁺, CZn y CTA. La variable operacional que más se ha seleccionado en la mayoría de las combinaciones es la EF, contrariamente a su contrapuesta CM, que ha sido seleccionada tan solo en el biorreactor QB. Por otro lado, la CO₃ presenta una influencia importante en los biorreactores en los cuales fue suministrado el ozono (CT1 y CT2). En general, los coeficientes de correlación (ρ) de las variables ambientales teniendo en cuenta su tipología se muestran muy similares en todos los biorreactores y la matriz total. En el grupo de variables FQLM destaca el mayor número de variables seleccionadas respecto al grupo anterior, siendo el NTLM, PTLM, IVF30 y la T^{ar} aquellas que más han contribuido a explicar la variabilidad de protistas y metazoos. Dentro de este grupo de variables destaca el elevado coeficiente de correlación de los biorreactores CXAB (0,58), CXCD (0,68) y la combinación de ambos, CX (0,64), y el bajo coeficiente (no significativo) en CT (0,14), CT2 (0,28) y DN (0,28). En este último biorreactor tan solo ha sido seleccionado el IVF5. Dentro del grupo de las variables FQAF, las variables más seleccionadas han sido las siguientes: DBO₅/PT, CAG, CPT y %DQOs. En este caso, los elevados coeficientes corresponden a CXAB (0,45), CXCD (0,56) y CX (0,50), mientras que el menor corresponde a CT (0,24).

La rutina BIO-ENV se ha empleado para comparar los coeficientes de correlación de los tres tipos de variables (OPE, FQLM y FQAF) entre los distintos biorreactores (figura 4.39). En dicha rutina se han incluido todas las variables utilizando como indicador la tipología de las mismas, siendo de esta forma comparable los coeficientes de correlación. Los resultados indican que las variables OPE presentan un coeficiente de correlación mayor en el caso de los biorreactores CT1 y CT2. Destaca por otro lado la elevada correlación de las variables FQLM y FQAF en CXAB y CXCD, siendo muy baja en el caso de las variables FQLM en DN.

Tabla 4.26. Variables ambientales seleccionadas en la rutina BVSTEP y coeficientes de correlación por tipología de variable y en cada uno de los biorreactores y matriz total, a partir de la abundancia de protistas y metazoos.

		QB	CXAB	CXCD	CX	DN	CT1	CT2	CT	Matriz total
OPE	EF		X	X	X	X		X	X	X
	CM	X								
	CMDQOs	>				X				X
	TRHr						X			
	TRHds					>	>		X	X
	SSLM, R.rec									
	ODm	X				X		X		
	ODa, ODb									
	CO ₃	-	-	-	-	-	X	X	X	
	(rho)	0,38*	0,40*	0,41*	0,43*	0,40*	0,48*	0,47*	0,39*	0,38*
FQLM	pHLM						X		X	
	CondLM	X		X					X	
	T ^{gr}		X	X	X		X			
	%SSVLM						X		X	
	IVF5	>		>	>	X	>	>	>	>
	IVF30	X					X	X	X	
	NTLM		X	X	X		X			X
	PTLM	X		X	X					X
	DQLM									
	(rho)	0,35*	0,58*	0,68*	0,64*	0,28	0,30*	0,28	0,14	0,26*
FQAF	%DQOs			X	X			X	X	
	DQO/DBO ₅							X		
	CNT			X						
	CN-NH ₄ ⁺						>			
	CPT		X	X	X					X
	CP-PO ₄ ³⁻	>	>	>	>	X				>
	CCarb							X		
	CProt	X								
	CAG		X	X	X		X		X	
	CAGV									X
	DBO ₅ /NT						X		X	
	DBO ₅ /PT					X	X	X	X	X
	CNi	X	-	-	-	-	-	-	-	-
	CZn, CTA		-	-	-	-	-	-	-	-
(rho)	0,36*	0,45*	0,56*	0,50*	0,40*	0,30*	0,31*	0,24*	0,32*	

*p<0,05

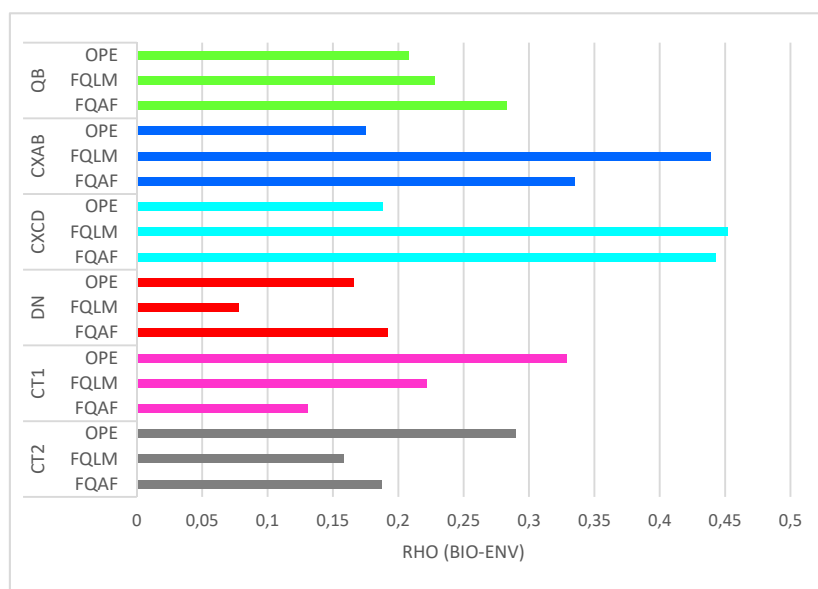


Figura 4.39. Coeficientes de correlación de la rutina BIO-ENV utilizando como indicador la tipología de las variables.

El modelo propuesto por la rutina BVSTEP cambia sustancialmente cuando todas las variables ambientales son procesadas sin considerar su tipología (tabla 4.27). En general, el modelo selecciona menos variables FQAF y FQLM respecto a los modelos seleccionados en los biorreactores en los que se tuvo en cuenta su tipología (tabla 4.26). Destaca la exclusión de la EF en el caso de CX, CXAB y CXCD, mientras que en CT, CT1 y CT2 destaca de forma significativa el menor número de variables FQLM y FQAF seleccionadas. Por otro lado, los resultados también indican que el modelo a partir de la matriz total reduce el coeficiente de correlación (0,44) respecto a los elevados valores encontrados de forma individual en algunos de los biorreactores, especialmente en CXAB (0,66), CXCD (0,74) y CX (0,70).

Tabla 4.27. Variables ambientales seleccionadas en la rutina BVSTEP y coeficientes de correlación sin categorizar variables y en cada uno de los biorreactores y matriz total, a partir de la abundancia de protistas y metazoos.

		QB	CXAB	CXCD	CX	DN	CT1	CT2	CT	Matriz total
OPE	EF					X		X	X	
	CM	X					X			
	CMDQOs	>							X	X
	TRHr						X			
	TRHds					>	>		X	
	SSLM									
	R.rec									
	ODb									
	ODm	X				X		X		
	ODa									
FQLM	CO ₃	-	-	-	-	-	X		X	X
	pHLM									
	CondLML									
	T _r		X	X	X		X	X		
	%SSVLM						X			
	IVF5	>		>	>	X	>	>	>	>
	IVF30	X						X		
	NLTM		X	X	X					X
	PTLM	X	X	X	X					X
	DQLM									
FQAF	%DQOs			X	X					X
	DQO/DBO ₅		X							X
	CNT			X						
	CN-NH ₄ ⁺						>			
	CPT									X
	CP-PO ₄ ³⁻		>	>	>					>
	CCarb		X		X					
	CProt									
	CAG						X		X	
	CAGV									
DBO ₅ /NT										
DBO ₅ /PT					X	X				
CNi	X	-	-	-	-	-	-	-	-	
CZn		-	-	-	-	-	-	-	-	
CTA		-	-	-	-	-	-	-	-	
(rho)		0,45*	0,66*	0,74*	0,70*	0,58*	0,56*	0,54*	0,44*	0,44*

La exploración de los modelos de regresión lineal múltiple multivariante basados en la distancia (DISTLM) se han realizado empleando procedimientos y criterios parsimoniosos. Dicha rutina estadística ha permitido responder a la pregunta; ¿cómo explica cada variable la variabilidad de la matriz distancia biológica?, entre las variables candidatas preseleccionadas en la rutina BVSTEP. El enfoque es similar al planteado anteriormente en la rutina BVSTEP, es decir, en dos sentidos. El primero trata de buscar los mejores modelos por tipo de variables (OPE, FQLM y FQAF), explorados de forma individual en cada uno de los biorreactores y en la matriz total. El segundo trata de comparar los modelos anteriores con los encontrados sin tener en cuenta la tipología de las variables ambientales, además de comparar la variabilidad individual entre los biorreactores y de estos con la matriz total. El efecto de la multicolinealidad se ha evaluado a partir del gráfico de dispersión de puntos, eliminando una variable de aquellos pares cuyos coeficientes de correlación de Spearman fueron superiores a 0,85 (marcadas con >).

Los resultados del test secuencial indican que entre las variables OPE, la EF es la que mejor explica la variabilidad de la matriz biológica en la mayoría de los modelos (tabla 4.28). En el caso de los biorreactores CXAB, CXCD y la combinación de ambos (CX) destaca la elevada variación explicada de la EF, siendo del 26,4%, 35,2% y 30,1%, respectivamente. De forma excepcional, la CM ha sido seleccionada como primera variable en el test secuencial del modelo de QB, mientras que el TRHr y la CO₃ lo han sido en el caso de CT1 y CT, respectivamente. En el caso de las variables FQLM, la T^{ar} ha sido seleccionada como primera variable en cinco modelos, destacando su elevado porcentaje de variación en el caso de CXAB (33,1%) y CX (34,4%). El NTLM mostró el mayor porcentaje de variación de todas las variables de su grupo en el reactor CXCD (39,8%). Dicho resultado podría estar relacionado con la ausencia de núcleos y mayor proporción de zonas aerobias observadas en la estructura flocular de la EDAR CX (figura 4.40). En el caso de las variables FQAF, la selección de variables en los biorreactores ha sido más heterogénea que en los dos casos anteriores. La CPT fue la primera variable seleccionada en los biorreactores CXAB, CXCD, CX y la matriz total, el %DQOs lo ha sido en CT2 y CT, mientras que la CAG lo ha sido en QB. En el caso del biorreactor DN, no se seleccionó ninguna variable FQAF. La variación biológica explicada en la matriz total para cada uno de los tres tipos de variables es menor en general que la explicada a partir de los modelos individuales correspondientes a los diferentes biorreactores.

Tabla 4.28. Test secuencial, procedimientos y criterios empleados en la rutina DISTLM por tipología de variable ambiental y en cada uno de los biorreactores y la matriz total, a partir de la abundancia de protistas y metazoos.

		QB	CXAB	CXCD	CX	DN	CT1	CT2	CT	Matriz total	
OPE	EF		26,4	35,2	30,1	11,4		14,0		10,1	
	CM	11,3									
	CMDQOs	>									
	TRHr				4,7		22,1				
	TRHds	6,9				>	>		8,4		
	SSLM		8,8		6,9					3,4	
	R.rec										
	ODb										
	ODm			10,3		8,5		12,8			
	ODa										
	CO ₃	-	-	-	-	-	12,9		12,0	7,4	
	Proced.	Step.	Step.	Step.	Step.	Forw.	Step.	Step.	Step.	Step.	
	Criterio	Adj. R ²	AIC _c	AIC _c	AIC _c	Adj. R ²	AIC _c	AIC _c	BIC	BIC	
	% Var. total	18,2	35,3	45,5	41,6	19,9	35,0	26,9	20,4	20,9	
FQLM	pHLM	5,7									
	CondLM	13,3		8,7				9,5			
	T ^{sr}	5,7	33,1	6,8	34,4		11,5	11,0	8,3	5,05	
	%SSVLM						9,3			9,79	
	IVF5	>		>	>	>	>	>	>	>	
	IVF30					17,4	9,5	7,3			
	NTLM		7,2	39,8	7,3						
	PTLM									8,17	
	DQLM										
	Proced.	Forw.	Forw.	Step.	Step.	Forw.	Forw.	Forw.	Forw.	Step.	
	Criterio	Adj. R ²	Adj. R ²	AIC _c	BIC	Adj. R ²	Adj. R ²	Adj. R ²	Adj. R ²	BIC	
	% Var. total	24,8	40,3	55,2	41,8	17,4	30,3	27,9	8,3	23,0	
	FQAF	%DQOs							12,5	10,8	3,4
		DQO/DBO ₅									
CNT											
CN-NH ₄ ⁺							>	>	>		
CPT			25,4	35,8	28,7					10,2	
CP-PO ₄ ³⁻		>	>	>	>		>			>	
CCarb											
CProt				7,1	4,0						
CAG		13,1	17,4	14,1	14,7		10,7		9,2	3,8	
CAGV											
DBO ₅ /NT							10,4	7,7			
DBO ₅ /PT							13,4	8,5		4,3	
CNi		7,4	-	-	-	-	-	-	-	-	
CZn			-	-	-	-	-	-	-	-	
CTA			-	-	-	-	-	-	-	-	
Proced.		forw.	forw.	step.	step.	-	step.	forw.	step.	step.	
Criterio		adj. R ²	adj. R ²	AIC _c	AIC _c	-	AIC _c	adj. R ²	AIC _c	BIC	
% Var. total		20,5	42,8	56,9	47,5	-	34,5	28,8	20,0	21,7	

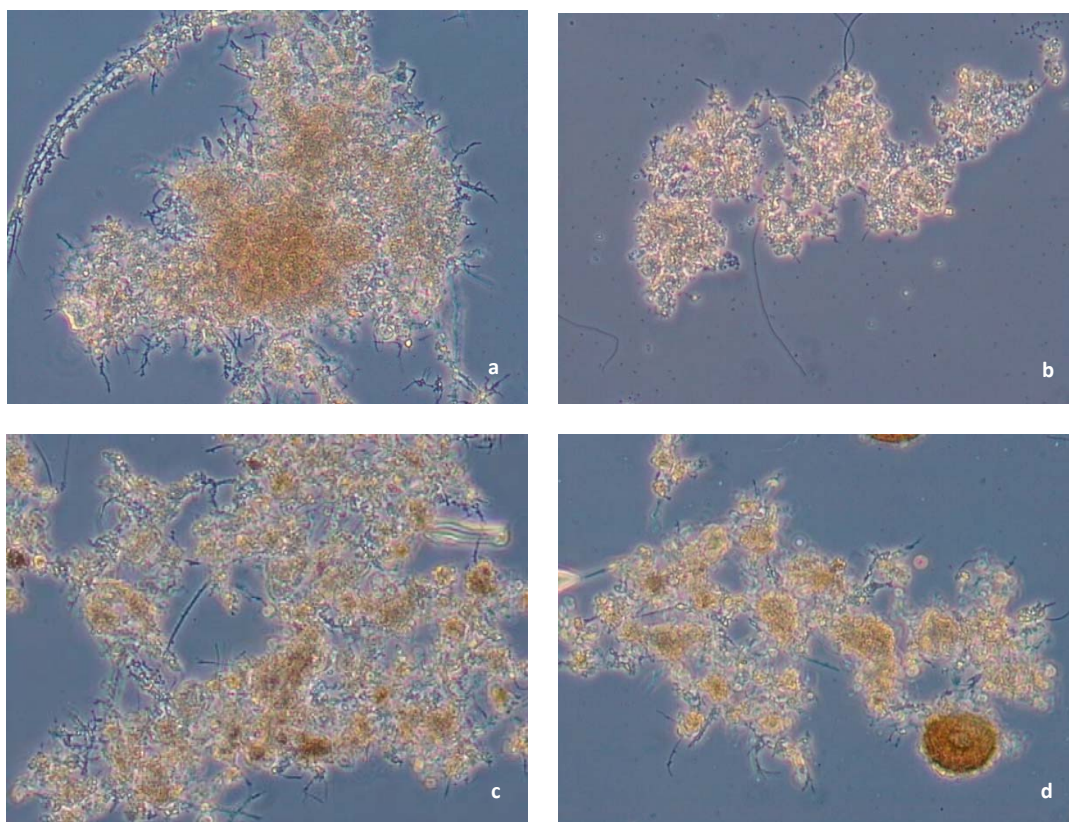


Figura 4.40. Estructura flocular en los biorreactores. (a) EDAR QB. Contraste de fases, 100x. (b) EDAR CX. Contraste de fases, 100x. (c) EDAR DN. Contraste de fases, 100x. (d) EDAR CT. Contraste de fases, 100x.

De forma similar a los resultados obtenidos a partir de la rutina BVSTEP (tabla 4.27), disminuye la presencia de variables OPE y FQAF en los modelos que no tienen en cuenta la tipología de las variables (tabla 4.29). Especialmente destaca la ausencia de variables OPE en los biorreactores de la EDAR CX y su baja presencia en la matriz total. En el caso de los biorreactores CT1, CT2 y su combinación (CT), las variables más significativas fueron el TRHr (22,1%), la EF (14,0%) y la CO₃ (12%). Con respecto a los biorreactores CXCD y la matriz total, las variables FQAF más significativas fueron la CCarb (8,8%) y CPT (10,3%). Respecto a las variables FQLM, la T^{ar}r muestra su mayor porcentaje de variación en CXAB (32,2%) y CX (34,4%), mientras que el IVF30 lo hace en DN (17,4%).

Tabla 4.29. Test secuencial, procedimientos y criterios empleados en la rutina DISTLM del total de variables ambientales y en cada uno de los biorreactores y la matriz total, a partir de la abundancia de protistas y metazoos.

		QB	CXAB	CXCD	CX	DN	CT1	CT2	CT	Matriz total
OPE	EF							14,0	7,6	
	CM	>								
	CMDQOs	6,9								
	TRHr						22,1			
	TRHds					>	>			
	SSLM									
	R.rec									
	ODb									
	ODm					8,9		12,8		
	ODa									
	CO ₃	-	-	-	-	-	12,9		12,0	6,9
FQLM	pHLM						9,4			
	CondLM	13,3								
	T ^{ar}		32,2	38,1	34,4			11,0		6,1
	%SSVLM									4,6
	IVF5	>		>	>		>	>	>	>
	IVF30	6,4				17,4				
	NTLM									
	PTLM			8,4	4,3					
	DQLM									
FQAF	%DQOs									
	DQO/DBO ₅		7,2							
	CNT									
	CN-NH ₄ ⁺						>	>	>	
	CPT		10,4	13,5	10,1					10,3
	CP-PO ₄ ³⁻	>	>	>	>		>			>
	CCarb									
	CProt									
	CAG			6,6	6,6				9,6	4,0
	CAGV					7,3				
	DBO ₅ /NT									
	DBO ₅ /PT									
	CNi		-	-	-	-	-	-	-	-
	CZn		-	-	-	-	-	-	-	-
	CTA		-	-	-	-	-	-	-	-
	Proced.	<i>forw.</i>	<i>step.</i>	<i>step.</i>	<i>Step.</i>	<i>forw.</i>	<i>step.</i>	<i>step.</i>	<i>Step.</i>	<i>Step.</i>
	Criterio	<i>adj. R²</i>	AIC _c	AIC _c	BIC	<i>adj. R²</i>	AIC _c	AIC _c	BIC	BIC
	% Var.	26,31	49,75	59,59	55,37	33,58	44,4	37,82	29,13	31,78

Descripción de los modelos de regresión lineal múltiple multivariante basados en la distancia

Los modelos que incluyen las variables ambientales sin categorizar excluyen de los mismos variables con un elevado porcentaje de variación explicada en los modelos en los cuales se tiene en cuenta la categoría, por ello, se ha optado principalmente por la descripción de estos últimos (tabla 4.30). Debido a que los biorreactores CXAB, CXCD y la combinación de ambos (CX) presentan resultados similares, se ha explorado este último para la interpretación ambiental de las categorías OPE y FQLM. Sin embargo, en el caso de las variables FQAF ha sido explorado el biorreactor CXCD por presentar un porcentaje mayor de variación que CXAB y CX. En el caso de CT2, ha sido

seleccionado respecto a CT por presentar mayor porcentaje de variación, y respecto a CT1, por los mayores coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables seleccionadas en los ejes del dbRDA.

Tabla 4.30. Porcentaje de variación explicada de la abundancia de protistas y metazoos por los ejes individuales en la rutina DISTLM, a partir de las variables ambientales categorizadas de los distintos biorreactores y la matriz total.

	Eje	Variación explicada del modelo ajustado		Variación explicada del total de la variación		
		Individual	Acumulada	Individual	Acumulada	
OPE	QB	1	70,58	70,58	12,84	12,84
		2	29,42	100	5,35	18,19
	CX	1	88,54	88,54	36,85	36,85
		2	7,01	95,55	2,92	39,76
		3	4,45	100	1,85	41,62
	DN	1	67,46	67,46	13,44	13,44
		2	32,54	100	6,48	19,93
	CT1	1	70,39	70,39	24,62	24,62
		2	29,61	100	10,36	34,98
	CT2	1	57,03	57,03	15,32	15,32
		2	42,97	100	11,54	26,86
	Total	1	67,19	67,19	14,04	14,04
		2	24,53	91,62	5,11	19,15
		3	8,38	100	1,75	20,9
	FQLM	QB	1	57,89	57,89	14,33
2			24,42	82,31	6,04	18,19
3			17,69	100	4,38	24,76
CX		1	98	98	40,94	40,74
		2	2	100	0,84	41,77
DN		1	100	100	17,4	17,4
CT1		1	43,98	43,98	13,33	13,33
		2	39,7	83,68	12,03	25,36
		3	16,32	100	4,95	30,31
CT2		1	53,1	53,1	14,79	14,79
		2	35,33	88,43	9,84	24,63
		3	11,57	100	3,22	27,86
Total		1	57,19	57,19	13,16	13,16
		2	29,56	86,75	6,8	19,96
		3	13,25	100	3,05	23
FQAF	QB	1	72,1	72,1	14,79	14,79
		2	27,9	100	5,72	20,52
	CXCD	1	82,98	82,98	47,24	47,24
		2	11,09	94,07	6,31	53,55
		3	5,93	100	3,38	56,93
	CT2	1	50,14	50,14	14,44	14,44
		2	37,31	87,45	10,75	25,19
		3	12,55	100	3,62	28,8
	Total	1	57	57	12,38	12,38
		2	19,68	76,69	4,27	16,65
		3	18,11	94,79	3,93	20,59
		4	5,21	100	1,13	21,72

a) Modelos de interpretación ambiental a partir de las variables operacionales (OPE)

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de variables OPE de QB indican una correlación negativa elevada de la CM y el TRHds con el dbRDA1 y dbRDA2, respectivamente (tabla 4.31). Los protistas y metazoos que más se relacionan ($r > 0,35$) con valores bajos de la CM son los siguientes: *P. trichophorum*, *E. sulcatum*, *T. minuta*, *Euglypha* sp., *C. hirtus*, *Lecane* sp., *A. variegatum* y el grupo de los gastrotricos. El diagrama de burbujas de la CM expresado en la figura del dbRDA indica que la abundancia de dichos organismos se encuentra influenciada por valores de la CM por debajo de 0,16 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d (figura 4.41). Por el contrario, *V. microstoma* y *E. affinis* parecen estar relacionados ($r > -0,40$) con valores de la CM superiores a 0,24 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d, aproximadamente, mientras que en *V. aquadulcis* la relación es moderada-baja ($r = -0,33$). Por otro lado, los organismos relacionados ($r > -0,40$) con valores del TRHds superiores a 6 horas son los siguientes: *U. nigricans*, *A. cicada*, *Lecane* sp. y los nematodos, mientras que las amebas desnudas grandes y *A. uncinata* lo hacen de forma moderada-baja ($r = -0,36$ y $-0,33$, respectivamente) (figura 4.41).

Tabla 4.31. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables OPE y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbRDA en QB.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2
QB	CM	-0,805	0,593
	TRHds	-0,593	-0,805
	<i>P. trichophorum</i>	0,70	-0,03
	<i>E. sulcatum</i>	0,35	-0,17
	<i>Euglypha</i> sp.	0,35	-0,29
	Amebas grandes	-0,28	-0,36
	<i>Coleps hirtus</i>	0,48	-0,07
	<i>U. nigricans</i>	-0,11	-0,40
	<i>A. cicada</i>	-0,01	-0,46
	<i>E. affinis</i>	-0,52	-0,07
	<i>T. minuta</i>	0,38	-0,26
	<i>A. uncinata</i>	-0,14	-0,33
	<i>P. fluviatilis</i>	0,34	0,16
	<i>V. microstoma</i>	-0,41	-0,15
	<i>V. aquadulcis</i>	-0,33	-0,17
	<i>Lecane</i> sp.	0,62	-0,49
	<i>A. variegatum</i>	0,45	-0,17
	Gastrotricos	0,69	0,12
	Nematodos	-0,11	-0,46

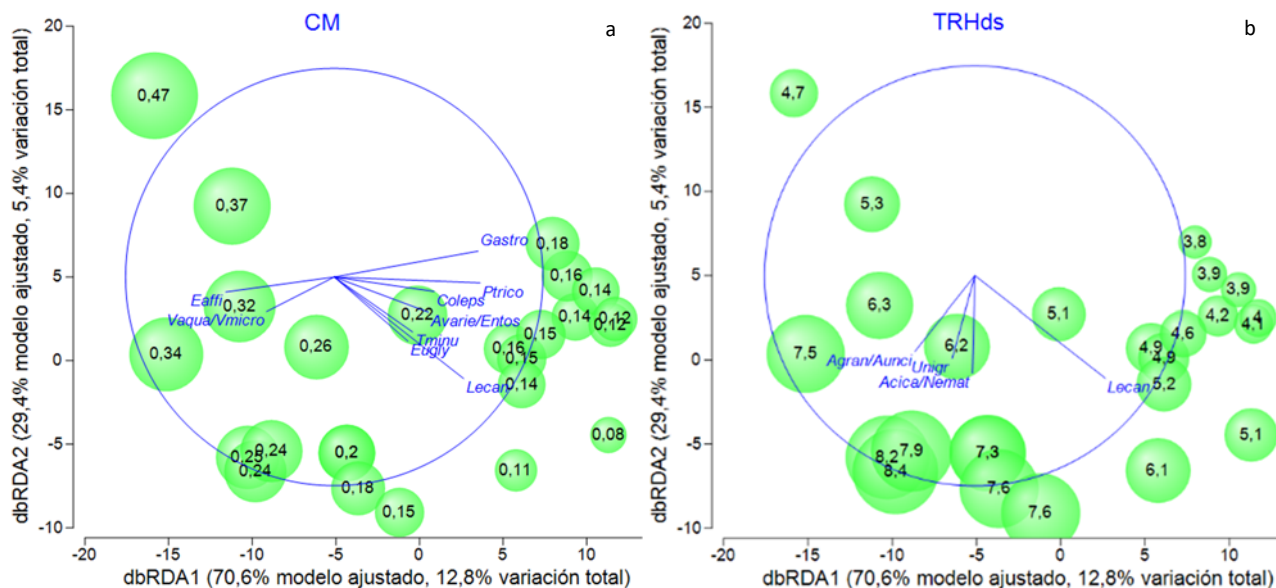


Figura 4.41. Gráfico de burbujas de la CM (a) y el TRHds (b) en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables OPE y la densidad de protistas y metazoos en QB. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,30 y -0,30.

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de variables OPE de CX indican una correlación negativa elevada de la EF y los SSLM con el dbRDA1 y dbRDA2, respectivamente, y positiva del TRHr con el dbRDA3 (tabla 4.32). Los protistas y metazoos que presentan una mayor relación ($r > -0,50$) con valores altos de la EF son los siguientes: *P. trichophorum*, *E. sulcatum*, *A. vulgaris*, *P. operculata*, *A. tuberosa*, *M. elegans*, *Periacineta* sp., *O. articulata*, *E. plicatilis*, *Rotaria* sp. y *Lecane* sp. El diagrama de burbujas de la EF expresado en la figura del dbRDA indica que los valores elevados de abundancia de dichos organismos se corresponden con valores de la EF superiores a 10 días (figura 4.42). Contrariamente, la densidad de *E. affinis*, *T. minuta*, *V. convallaria* y *O. coarctata* parecen encontrarse asociados ($r > 0,40$) con valores de la EF inferiores a 10 días. Por otro lado, *L. lamella* y *M. elegans* se relacionan con baja y elevada concentración de SSLM, respectivamente. Los coeficientes de correlación encontrados de los diferentes organismos con el dbRDA3, relacionado con el TRHr, fueron en general bajos.

Tabla 4.32. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables OPE y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbRDA en CX.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3
CX	EF	-0,968	-0,062	-0,242
	SSLM	0,083	-0,993	-0,080
	TRHr	-0,236	-0,098	0,967
	<i>P. trichophorum</i>	-0,77	-0,08	0,06
	<i>E. sulcatum</i>	-0,70	-0,13	0,11
	<i>A. vulgaris</i>	-0,61	0,08	-0,12
	<i>P. operculata</i>	-0,51	-0,13	-0,24
	Amebas grandes	-0,45	0,15	0,17
	<i>L. lamella</i>	-0,02	0,39	0,32
	<i>A. tuberosa</i>	-0,76	-0,05	0,07
	<i>M. elegans</i>	-0,59	-0,42	-0,24
	<i>Periacineta</i> sp.	-0,68	-0,22	0,08
	<i>U. nigricans</i>	-0,41	-0,001	0,15
	<i>E. affinis</i>	0,40	0,03	0,19
	<i>P. fluviatilis</i>	-0,40	0,28	-0,06
	<i>T. minuta</i>	0,53	0,21	0,01
	<i>G. membranaceus</i>	-0,38	0,08	-0,002
	<i>O. articulata</i>	-0,56	0,004	0,002
	<i>E. plicatilis</i>	-0,61	-0,01	0,15
	<i>E. balatonica</i>	-0,43	0,08	0,08
	<i>V. convallaria</i>	0,51	-0,27	0,06
	<i>O. coarctata</i>	0,68	-0,09	0,05
	<i>Rotaria</i> sp.	-0,62	-0,05	0,09
	<i>Lecane</i> sp.	-0,70	-0,11	0,15

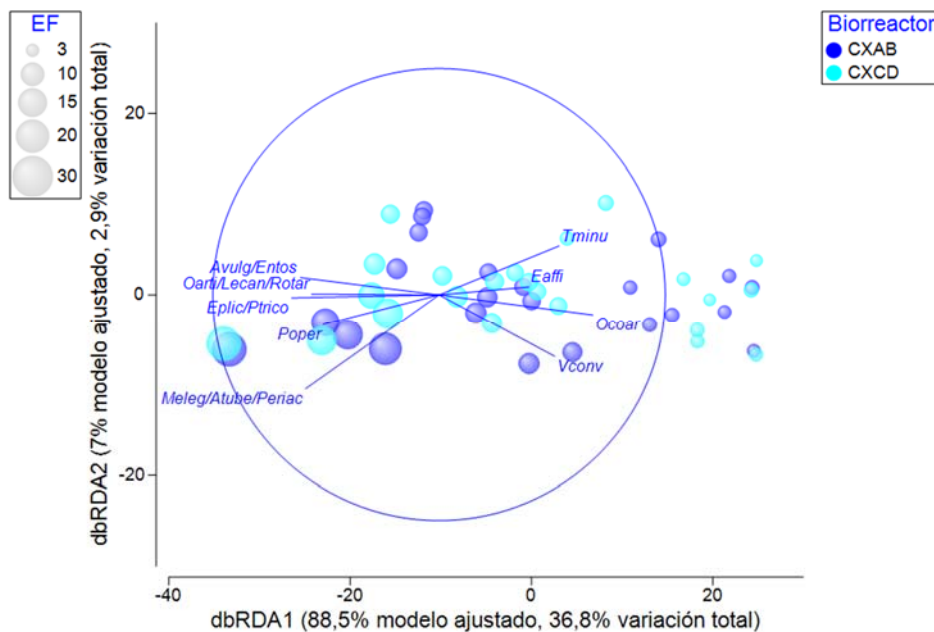


Figura 4.42. Gráfico de burbujas de la EF en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables OPE y la densidad de protistas y metazoos en CXAB y CXCD. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,40 y -0,50.

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de variables OPE de CT1 indican una elevada correlación negativa del TRHr y CO₃ con el dbRDA1 y dbRDA2, respectivamente (tabla 4.33). Los protistas y metazoos que más se relacionan ($r > -0,50$) con valores altos del TRHr son: *P. trichophorum*, *A. vulgaris*, *P. fluviatilis*, *A. uncinata*, *O. articulata*, *M. elegans*, *Periacineta* sp. y los gastrotricos, mientras que *A. cicada* se relaciona ($r = 0,51$) con bajo TRHr. Por último, *A. vulgaris*, *U. nigricans* y *A. cicada* se relacionan ($r > -0,40$) con elevada CO₃ en CT1.

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de variables OPE de CT2 indican una elevada correlación negativa de la EF y ODm con el dbRDA1 y dbRDA2, respectivamente (tabla 4.33). Los protistas y metazoos que más se relacionan ($r > -0,35$) con valores altos de la EF son: *A. vulgaris*, *Lecane* sp. y *O. articulata*. El diagrama de burbujas de la EF expresado en la figura del dbRDA indica que valores por encima de 10 días influyen en la abundancia de dichos organismos (figura 4.43). Contrariamente, *T. infusionum*, *P. fluviatilis*, *P. trichophorum*, *A. cicada* y *Bodo saltans* parecen encontrarse asociados ($r > 0,35$) con valores de la EF inferiores a 10 días.

Tabla 4.33. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables OPE y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbRDA en CT1 y CT2.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2
CT1	TRHr	-0,770	-0,638
	CO₃	0,638	-0,770
	<i>P. trichophorum</i>	-0,56	-0,04
	<i>A. vulgaris</i>	-0,76	-0,42
	Amebas grandes	-0,39	0,15
	<i>T. infusionum</i>	0,45	-0,08
	<i>U. nigricans</i>	0,16	-0,64
	<i>A. cicada</i>	0,51	-0,57
	<i>P. fluviatilis</i>	-0,59	0,03
	<i>A. uncinata</i>	-0,74	0,36
	<i>O. articulata</i>	-0,70	0,05
	<i>E. chrysemidis</i>	-0,46	-0,26
	<i>V. aquadulcis</i>	0,37	-0,27
	<i>C. polypinum</i>	-0,43	-0,01
	<i>V. microstoma</i>	-0,38	-0,13
	<i>V. infusionum</i>	-0,39	0,17
Gastrotricos	-0,65	0,05	
CT2	EF	-0,766	-0,642
	ODm	0,642	-0,766
	<i>Bodo saltans</i>	0,37	0,16
	<i>P. trichophorum</i>	0,55	0,27
	<i>A. vulgaris</i>	-0,70	0,16
	Amebas pequeñas	-0,14	0,61
	<i>T. infusionum</i>	0,37	0,23
	<i>Periacineta</i> sp.	-0,32	0,36
	<i>A. cicada</i>	0,46	0,14
	<i>P. fluviatilis</i>	0,36	0,10
	<i>G. membranaceus</i>	0,08	-0,54
	<i>A. uncinata</i>	0,31	0,53
	<i>O. articulata</i>	-0,41	0,39
	<i>V. infusionum</i>	-0,22	0,53
	<i>Lecane</i> sp.	-0,50	0,17
	Nematodos	-0,15	0,38

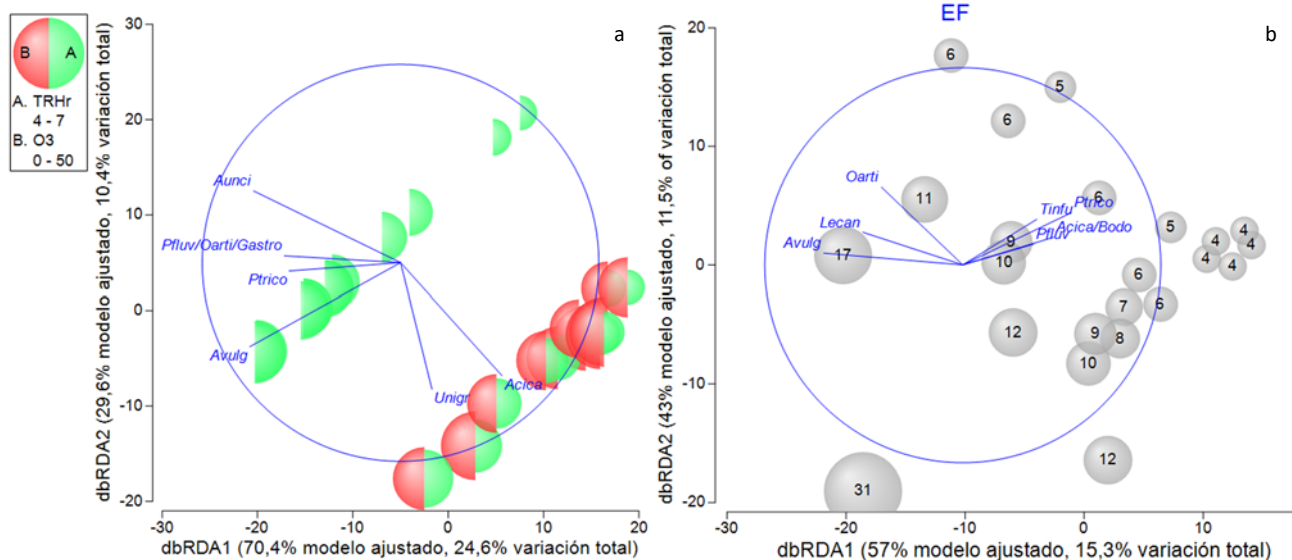


Figura 4.43. Gráfico de burbujas del TRHr y CO₃ (a) y EF (b) en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables OPE y la densidad de protistas y metazoos en CT1 y CT2. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de -0,50 (dbRDA1) y -0,40 (dbRDA2) en CT1, y mayores de -0,35 y 0,35 en CT2.

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de variables OPE de DN indican una correlación positiva elevada de la EF y ODM con el dbRDA1 y dbRDA2, respectivamente (tabla 4.34). Los protistas y metazoos que más se relacionan ($r > 0,35$) con alta EF son: *P. trichophorum*, *A. tuberosa*, *E. balatonica* y *V. convallaria*. El diagrama de burbujas de la EF en el dbRDA indica que la abundancia de dichos organismos se encuentra influenciada por valores de EF por encima de 20 días (figura 4.44). Contrariamente, *E. sulcatum*, amebas pequeñas, *A. cicada*, *P. fluviatilis* y *Pseudovorticella* sp. se encuentran asociados ($r > -0,35$) con valores de la EF inferiores a 20 días. Por último, *P. pusillum*, *A. uncinata*, *Lecane* sp. y *T. kellcottiana* se relacionan con valores bajos de ODM.

Tabla 4.34. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables OPE y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbRDA en DN.

Biorreactor	Variabes	dbRDA1	dbRDA2
DN	EF	0,745	-0,668
	ODm	0,668	0,745
	<i>P. trichophorum</i>	0,47	0,13
	<i>E. sulcatum</i>	-0,42	0,20
	Amebas pequeñas	-0,64	-0,11
	<i>A. tuberosa</i>	0,38	0,08
	<i>P. pusillum</i>	0,04	-0,43
	<i>A. cicada</i>	-0,39	0,38
	<i>P. fluviatilis</i>	-0,42	-0,07
	<i>A. uncinata</i>	-0,24	-0,38
	<i>E. balatonica</i>	0,62	0,30
	<i>V. convallaria</i>	0,47	-0,26
	<i>T. kellcottiana</i>	0,05	-0,40
	<i>Pseudovorticella</i> sp.	-0,39	-0,19
<i>Lecane</i> sp.	0,15	-0,39	

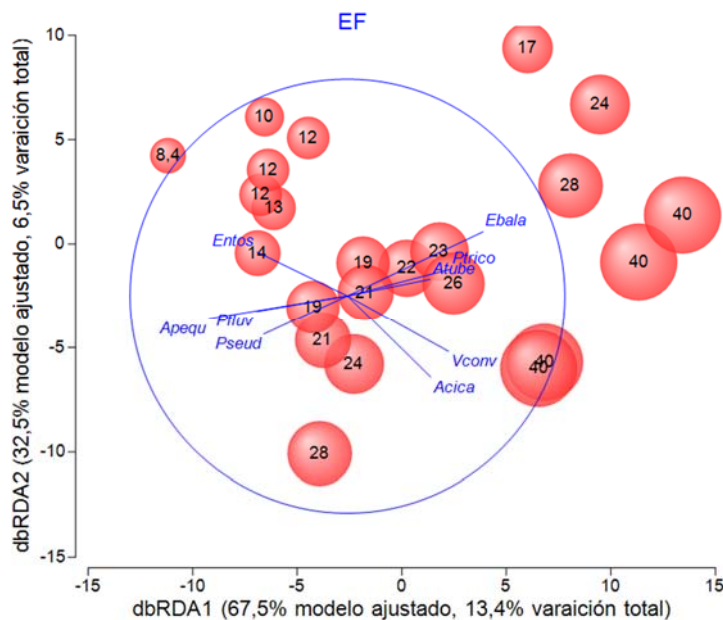


Figura 4.44. Gráfico de burbujas de la EF en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables OPE y la densidad de protistas y metazoos en DN. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,35 y -0,35.

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de variables OPE de la matriz total indican una correlación positiva elevada de la EF y CO_3 con el dbRDA1 y dbRDA3, respectivamente, y negativa de la concentración de SLM con el dbRDA2 (tabla 4.35). El número de organismos relacionados con las variables ambientales en la matriz total, así como sus coeficientes de correlación, son en general menor que los encontrados de forma individual en los biorreactores. Los protistas y metazoos que más se relacionan ($r > 0,30$) con valores altos de la EF son los siguientes: *P. operculata*, amebas desnudas grandes, *P. trichophorum*, *E. sulcatum*, *A. vulgaris*, *A. tuberosa*, *T. minuta*, *E. plicatilis*, *P. fluvialis*, *Rotaria* sp., *Lecane* sp. y *O. articulata*. El diagrama de burbujas de la EF expresado en la figura del dbRDA indica que la abundancia de dichos organismos se encuentra influenciada por valores de la EF por encima de 10 días, aproximadamente (figura 4.45). De forma contraria, *A. cicada*, *V. aquadulcis* y *T. infusionum* se encuentran asociados ($r > -0,30$) con valores de la EF inferiores a 10 días. Por otro lado, la baja concentración de SLM muestra una relación directa con las siguientes especies de protistas: *O. coarctata* ($r = 0,48$), *E. affinis* ($r = 0,52$), *E. plicatilis* ($r = 0,30$) y *V. infusionum* ($r = 0,32$). Los coeficientes de correlación encontrados de los diferentes protistas y metazoos con el eje del dbRDA3, relacionado con la CO_3 , fueron en general bajos, siendo el mayor el correspondiente a la especie *U. nigricans* ($r = 0,30$).

Tabla 4.35. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables OPE y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbRDA en la matriz total.

Biorreactor	VARIABLES	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3
TOTAL	EF	0,747	-0,604	0,276
	CO₃	-0,575	-0,380	0,725
	SSLM	-0,333	-0,701	-0,631
	<i>P. trichophorum</i>	0,50	-0,02	-0,02
	<i>E. sulcatum</i>	0,50	0,04	0,13
	<i>A. vulgaris</i>	0,41	-0,25	0,05
	<i>P. operculata</i>	0,31	-0,05	0,07
	Amebas grandes	0,32	0,17	0,03
	<i>T. infusioenum</i>	-0,35	-0,02	-0,06
	<i>U. nigricans</i>	0,09	0,03	0,30
	<i>P. fluviatilis</i>	0,30	0,06	-0,03
	<i>A. tuberosa</i>	0,53	-0,12	-0,05
	<i>A. cicada</i>	-0,38	-0,08	0,07
	<i>E. affinis</i>	-0,03	0,52	0,10
	<i>T. minuta</i>	0,35	0,14	0,004
	<i>E. plicatilis</i>	0,31	0,30	0,17
	<i>V. aquadulcis</i>	-0,30	0,21	0,03
	<i>V. infusioenum</i>	0,06	0,32	0,08
	<i>O. articulata</i>	0,41	-0,14	-0,001
	<i>O. coarctata</i>	-0,15	0,48	-0,03
	<i>Rotaria</i> sp.	0,45	-0,10	0,05
	<i>Lecane</i> sp.	0,56	0,08	0,23

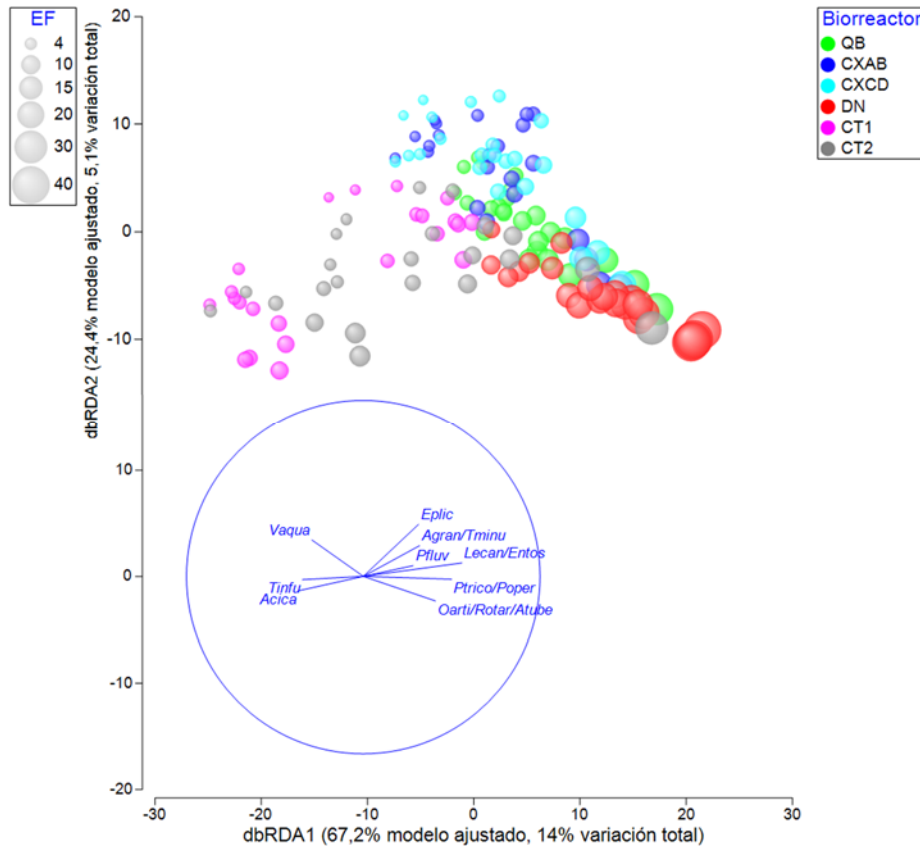


Figura 4.45. Gráfico de burbujas de la EF en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables OPE y la densidad de protistas y metazoos en la matriz total. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,30 y -0,30.

b) Modelos de interpretación ambiental a partir de las variables fisicoquímicas del licor mezcla (FQLM)

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de variables FQLM del biorreactor QB indican una correlación positiva elevada de la CondLM y el pHLM con el dbRDA1 y dbRDA3, respectivamente, y negativa de la T^ar con el dbRDA2 (tabla 4.36). Los protistas y metazoos que más se relacionan ($r > 0,40$) con valores altos de la CondLM son los siguientes: *V. aquadulcis*, *E. affinis* y *V. microstoma* (figura 4.46). Contrariamente, *P. trichophorum*, *E. sulcatum*, *Euglypha* sp., *C. hirtus*, *T. minuta*, *G. membranaceus* y el grupo de los gastrotricos se encuentran asociados ($r > -0,35$) con valores bajos de la CondLM. Además, en la figura se puede observar que la CondLM está directamente relacionada con el incremento de la CM. Por otro lado, los coeficientes de correlación encontrados con la T^ar (dbRDA2) son en general bajos, destacando la relación de *P. fluviatilis* ($r = -0,49$) y los nematodos ($r = 0,55$) con elevada y baja T^ar, respectivamente. En el caso del dbRDA3, relacionado con el pHLM, los resultados indican una relación directa con *M. elegans* ($r = 0,50$) y *E. affinis* ($r = 0,39$), siendo inversa en el caso de *E. chrysemidis* ($r = -0,40$), *Lecane* sp. ($r = -0,47$) y *A. variegatum* ($r = -0,46$).

Tabla 4.36. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQLM y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbRDA en QB.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3
QB	CondLM	0,908	-0,310	0,283
	pHLM	-0,409	-0,504	0,761
	T^ar	-0,093	-0,806	-0,584
	<i>P. trichophorum</i>	-0,55	0,07	-0,16
	<i>E. sulcatum</i>	-0,41	0,24	0,15
	<i>Euglypha</i> sp.	-0,45	0,37	0,03
	<i>Centropyxis</i> sp.	-0,20	-0,38	0,03
	<i>Coleps hirtus</i>	-0,39	0,09	0,34
	<i>M. elegans</i>	-0,10	-0,05	0,50
	<i>E. affinis</i>	0,42	-0,12	0,39
	<i>P. fluviatilis</i>	-0,33	-0,49	0,04
	<i>T. minuta</i>	-0,36	0,33	-0,04
	<i>G. membranaceus</i>	-0,48	0,36	0,12
	<i>O. articulata</i>	0,19	0,35	-0,004
	<i>E. chrysemidis</i>	-0,27	-0,06	-0,40
	<i>V. aquadulcis</i>	0,45	-0,21	-0,13
	<i>C. polypinum</i>	-0,03	0,36	0,06
	<i>V. microstoma</i>	0,64	0,22	0,02
	<i>Lecane</i> sp.	-0,19	0,20	-0,47
	<i>A. variegatum</i>	-0,12	0,06	-0,46
Gastrotricos	-0,74	-0,13	-0,04	
Nematodos	0,17	0,55	-0,08	

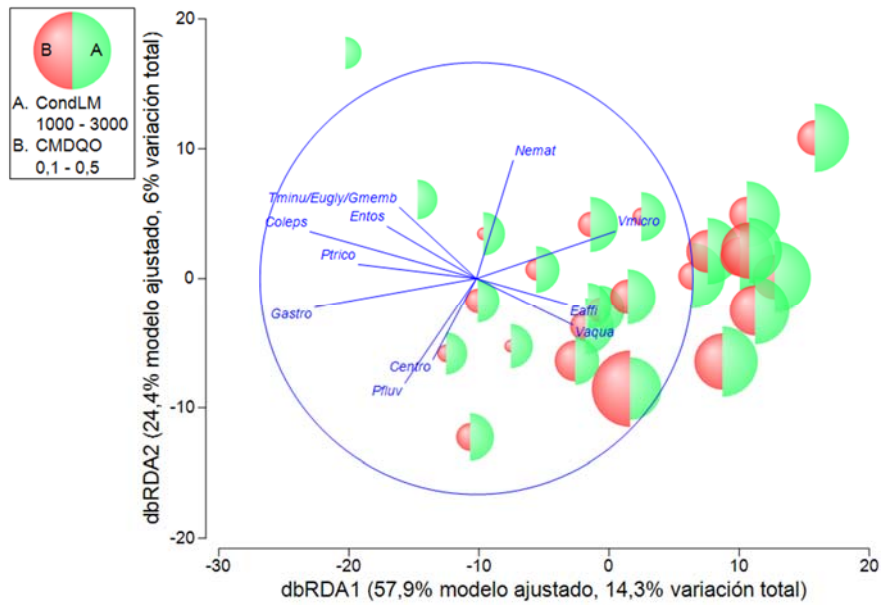


Figura 4.46. Gráfico de burbujas de la CondLM y la EF en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables FQLM y la densidad de protistas y metazoos en QB. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,40 y -0,35.

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de variables FQLM del biorreactor CX indican una elevada correlación positiva de la T^a r y el NTLM con el dbRDA1 y dbRDA2, respectivamente (tabla 4.37). Los protistas y metazoos que más se relacionan ($r > 0,50$) con valores altos de la T^a r (por encima de 20 °C) son los siguientes: *P. trichophorum*, *E. sulcatum*, *A. vulgaris*, *P. operculata*, *A. punctatus*, *A. tuberosa*, *Periacineta* sp., *Rotaria* sp., *Lecane* sp., *U. nigricans*, *P. fluviatilis*, *O. articulata*, *E. plicatilis* y *E. balatonica*. Por debajo de este valor se encuentran relacionados ($r > -0,35$) los siguientes: *E. affinis*, *T. minuta*, *V. convallaria*, *V. microsotoma* y *V. infusionum*.

Tabla 4.37. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQLM y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbRDA en CX.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2
CX	T^ar	0,712	0,702
	NTLM	-0,702	0,712
	<i>P. trichophorum</i>	0,74	-0,14
	<i>E. sulcatum</i>	0,79	0,03
	<i>A. vulgaris</i>	0,70	0,17
	<i>P. operculata</i>	0,53	0,04
	Amebas grandes	0,41	0,02
	<i>A. punctatus</i>	0,54	-0,21
	<i>A. tuberosa</i>	0,81	0,03
	<i>M. elegans</i>	0,39	-0,19
	<i>Periacineta</i> sp.	0,73	-0,08
	<i>U. nigricans</i>	0,50	-0,08
	<i>E. affinis</i>	-0,51	0,07
	<i>P. fluviatilis</i>	0,56	0,03
	<i>T. minuta</i>	-0,46	0,04
	<i>G. membranaceus</i>	0,38	0,18
	<i>O. articulata</i>	0,67	0,03
	<i>E. plicatilis</i>	0,78	-0,03
	<i>E. balatonica</i>	0,50	-0,11
	<i>V. convallaria</i>	-0,36	-0,12
	<i>O. coarctata</i>	-0,67	0,03
	<i>V. microstoma</i>	-0,39	-0,20
	<i>V. infusionum</i>	-0,40	-0,05
	<i>Rotaria</i> sp.	0,67	-0,12
	<i>Lecane</i> sp.	0,73	0,03

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de variables FQLM del biorreactor CT1 indican una correlación positiva del %SSVLM con el dbRDA1 y el dbRDA3, una correlación negativa y positiva del IVF30 con el dbRDA1 y el dbRDA3, respectivamente, y una elevada correlación negativa de la T^ar con el dbRDA2 (tabla 4.38). Los protistas y metazoos más relacionados ($r > -0,50$) con valores altos del IVF30 (superiores a 100 mL/g) y bajos del %SSVLM son: amebas desnudas pequeñas, *A. uncinata*, *O. articulata*, *V. convallaria*, *Lecane* sp, y *V. infusionum*, mientras que los relacionados ($r > 0,40$) con valores elevados del IVF30 (superiores a 100 mL/g) y %SSVLM son los siguientes: *Pseudovorticella* sp. y *O. articulata* (figura 4.47). Los protistas y metazoos que se relacionan ($r > -0,40$) de forma significativa con elevados valores de la T^ar (superiores a 20 °C) son: *A. tuberosa* y *A. uncinata*, mientras que por debajo de dicho valor se encuentran relacionados ($r > 0,35$): *U. nigricans*, *A. cicada*, *V. microstoma* y *V. convallaria*.

Tabla 4.38. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQLM y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbRDA en CT1 y CT2.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3
CT1	T²r	0,371	-0,924	0,096
	IVF30	-0,690	-0,205	0,694
	%SSVLM	0,621	0,324	0,714
	<i>Bodo saltans</i>	-0,41	0,22	-0,27
	Amebas pequeñas	-0,53	0,07	-0,18
	<i>A. tuberosa</i>	-0,24	-0,45	0,23
	<i>U. nigricans</i>	0,15	0,65	-0,02
	<i>A. cicada</i>	0,45	0,49	-0,008
	<i>A. uncinata</i>	-0,58	-0,41	0,07
	<i>O. articulata</i>	-0,51	-0,004	0,41
	<i>V. aquadulcis</i>	0,36	0,04	0,06
	<i>V. convallaria</i>	-0,52	0,41	-0,26
	<i>Pseudovorticella</i> sp.	0,15	0,07	0,47
	<i>V. microstoma</i>	-0,44	0,35	0,31
	<i>V. infusionum</i>	-0,68	0,12	0,03
	<i>Lecane</i> sp.	-0,51	0,34	-0,06
	Nematodos	-0,41	0,09	-0,31
CT2	T²r	-0,617	0,716	-0,327
	CondLM	-0,375	-0,633	-0,677
	IVF30	0,692	0,295	-0,659
	<i>A. vulgaris</i>	-0,41	-0,27	0,11
	Amebas grandes	0,31	-0,25	-0,37
	Amebas pequeñas	-0,36	-0,37	-0,17
	<i>A. punctatus</i>	-0,44	-0,19	0,14
	<i>T. quadripartita</i>	0,47	-0,14	0,20
	<i>A. tuberosa</i>	-0,43	0,15	0,17
	<i>U. nigricans</i>	0,27	-0,35	-0,17
	<i>P. fluviatilis</i>	-0,33	0,48	-0,10
	<i>G. membranaceus</i>	0,61	0,02	0,07
	<i>A. uncinata</i>	-0,25	-0,09	-0,46
	<i>O. articulata</i>	-0,51	-0,23	-0,27
	<i>E. balatonica</i>	-0,04	-0,39	0,04
	<i>V. aquadulcis</i>	0,12	0,55	0,39
	<i>V. convallaria</i>	0,44	-0,21	0,15
	<i>Pseudovorticella</i> sp.	0,39	0,34	0,03
	<i>C. polypinum</i>	0,60	0,09	-0,001
	<i>V. microstoma</i>	0,23	-0,58	-0,007
<i>V. infusionum</i>	-0,20	-0,52	0,13	
<i>Rotaria</i> sp.	-0,29	0,39	0,25	

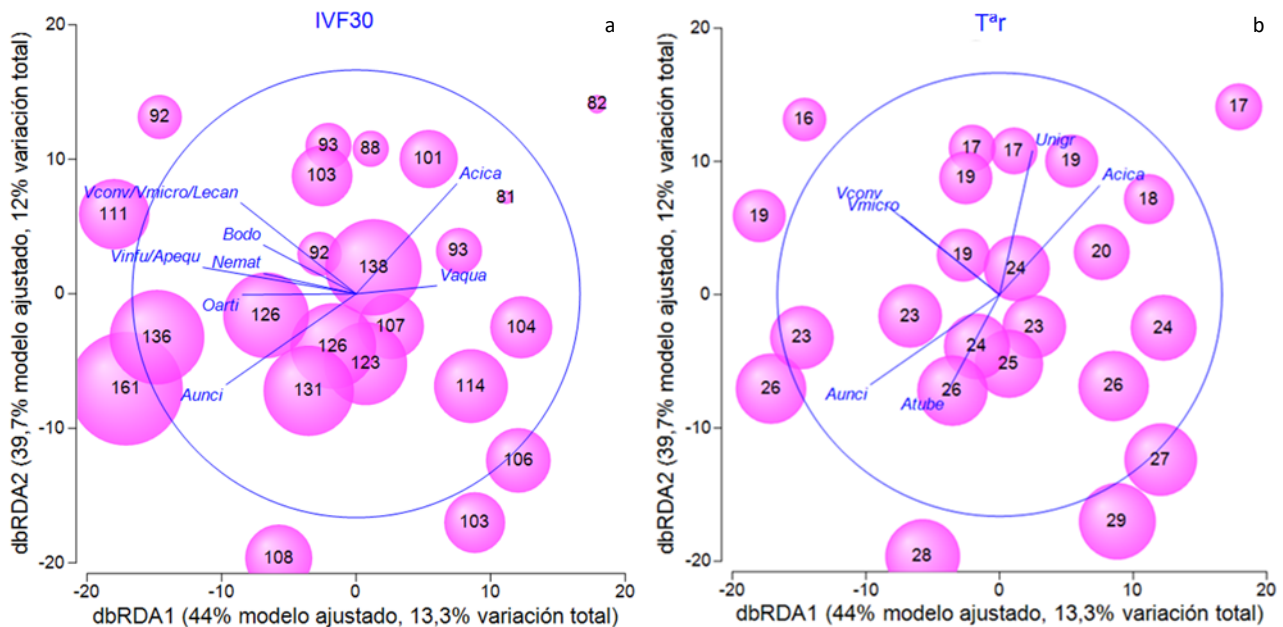


Figura 4.47. Gráfico de burbujas del IVF30 (a) y la T^ar (b) en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables FQLM y la densidad de protistas y metazoos en CT1. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de -0,50 y 0,40 (IVF30), y mayores de -0,40 y 0,35 (T^ar).

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de variables FQLM del biorreactor CT2 indican una correlación negativa de la T^ar y positiva del IVF30 con el dbRDA1, una correlación positiva de la T^ar y negativa de la CondLM con el dbRDA2, y una correlación negativa del IVF30 y la CondLM con el dbRDA3 (tabla 4.38). Los protistas y metazoos más relacionados ($r > -0,40$) con valores de la T^ar superiores a 20 °C y del IVF30 inferiores a 100 mL/g son: *A. vulgaris*, *A. punctatus*, *A. tuberosa* y *O. articulata*, mientras que relacionados ($r > 0,40$) de forma inversa se encuentran: *T. quadripartita*, *G. membranaceus*, *V. convallaria* y *C. polypinum* (figura 4.48). Los protistas y metazoos que se relacionan ($r > 0,40$) de forma significativa con valores de la T^ar por encima de 20 °C y con CondLM inferiores a 2500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ son los siguientes: *P. fluviatilis* y *V. aquadulcis*, mientras que de forma negativa ($r > -0,40$) lo hacen las siguientes especies: *V. microstoma* y *V. infusionum*. Por último, *A. uncinata* se encuentra relacionada ($r = -0,46$) con altos valores del IVF y CondLM en el eje dbRDA3.

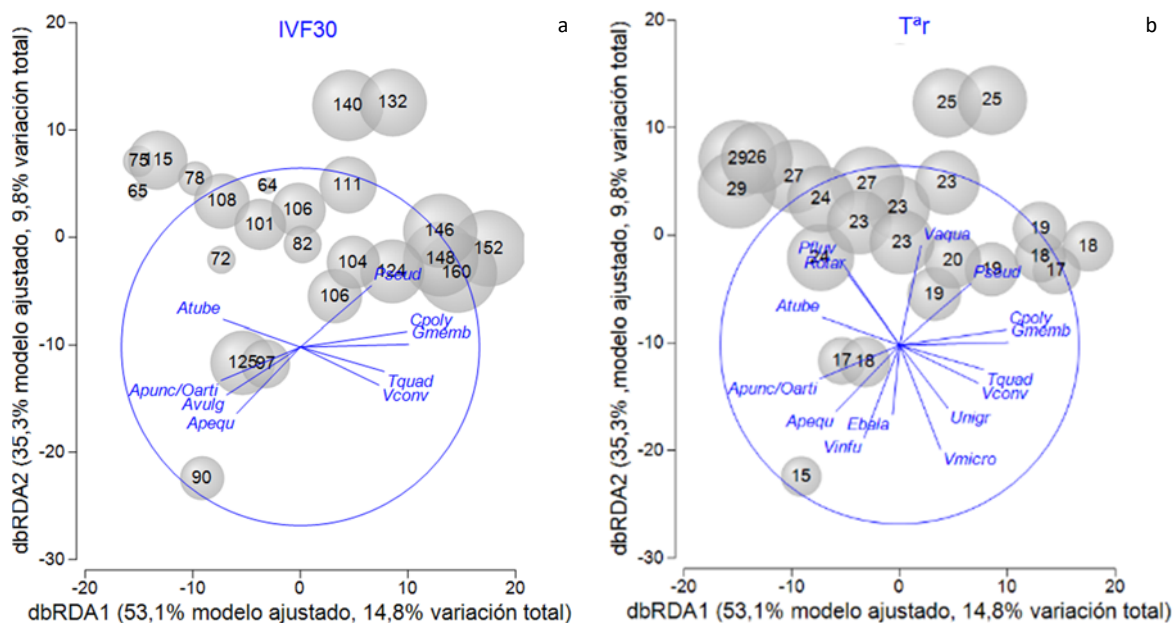


Figura 4.48. Gráfico de burbujas del IVF30 (a) y la T^ar (b) en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables FQLM y la densidad de protistas y metazoos en CT2. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,40 y -0,40.

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de variables FQLM de la matriz total indican una correlación negativa y positiva del PTLM con el dbRDA1 y dbRDA2, respectivamente, una correlación negativa del %SSVLM con el dbRDA2, y una correlación negativa de la T^ar con el dbRDA3. Debido a que el diagrama de burbujas del modelo resultante del dbRDA muestra una gran influencia de los valores elevados del PTLM en CT, por encima del rango del resto de biorreactores, se ha optado por excluirlo con el fin de equilibrar la contribución del resto de variables, como por ejemplo la T^ar. El nuevo modelo de interpretación ambiental muestra una correlación positiva del %SSVLM y negativa de la T^ar con el dbRDA1, una correlación positiva del pHLM con el dbRDA2 y una correlación negativa de la T^ar con el dbRDA3 (tabla 4.39). Los protistas y metazoos más relacionados ($r > 0,30$) con valores elevados de la T^ar (por encima de 20 °C) y bajos del %SSVLM son los siguientes: *A. vulgaris*, *A. tuberosa*, *P. fluviatilis* y *O. articulata*, mientras que relacionados ($r > 0,30$) con valores bajos de la T^ar (inferiores a 20 °C) y elevados del %SSVLM se encuentran: *E. affinis*, *V. convallaria*, *O. coarctata* y *V. microstoma* (figura 4.49). En el eje dbRDA2, relacionado ($r > 0,30$) con elevado pHLM se encuentra: *E. sulcatum*, *E. affinis*, *E. plicatilis*, *Rotaria* sp. y *C. polypinum*. Por último, la especie *V. aquadulcis* se encuentra relacionada ($r = -0,35$) con elevada T^ar en el dbRDA3, mientras que *T. minuta* ($r = 0,42$) lo hace para bajos valores.

Tabla 4.39. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQLM y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbRDA en la matriz total.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3
TOTAL	%SSVLM	0,731	0,432	-0,528
	T ^{ar}	-0,644	0,180	-0,744
	pHLM	-0,226	0,884	0,410
	<i>E. sulcatum</i>	-0,05	0,34	0,09
	<i>A. vulgaris</i>	-0,33	-0,05	0,18
	<i>A. tuberosa</i>	-0,34	0,21	0,03
	<i>E. affinis</i>	0,48	0,31	-0,07
	<i>P. fluviatilis</i>	-0,32	0,26	-0,11
	<i>T. minuta</i>	0,15	0,10	0,42
	<i>O. articulata</i>	-0,34	0,08	0,17
	<i>E. plicatilis</i>	0,11	0,39	-0,27
	<i>V. aquadulcis</i>	0,16	0,05	-0,35
	<i>V. convallaria</i>	0,40	0,11	0,09
	<i>C. polypinum</i>	0,17	0,30	-0,12
	<i>O. coarctata</i>	0,47	0,14	0,05
	<i>V. microstoma</i>	0,37	-0,09	0,06
	<i>Rotaria sp.</i>	-0,05	0,36	-0,04

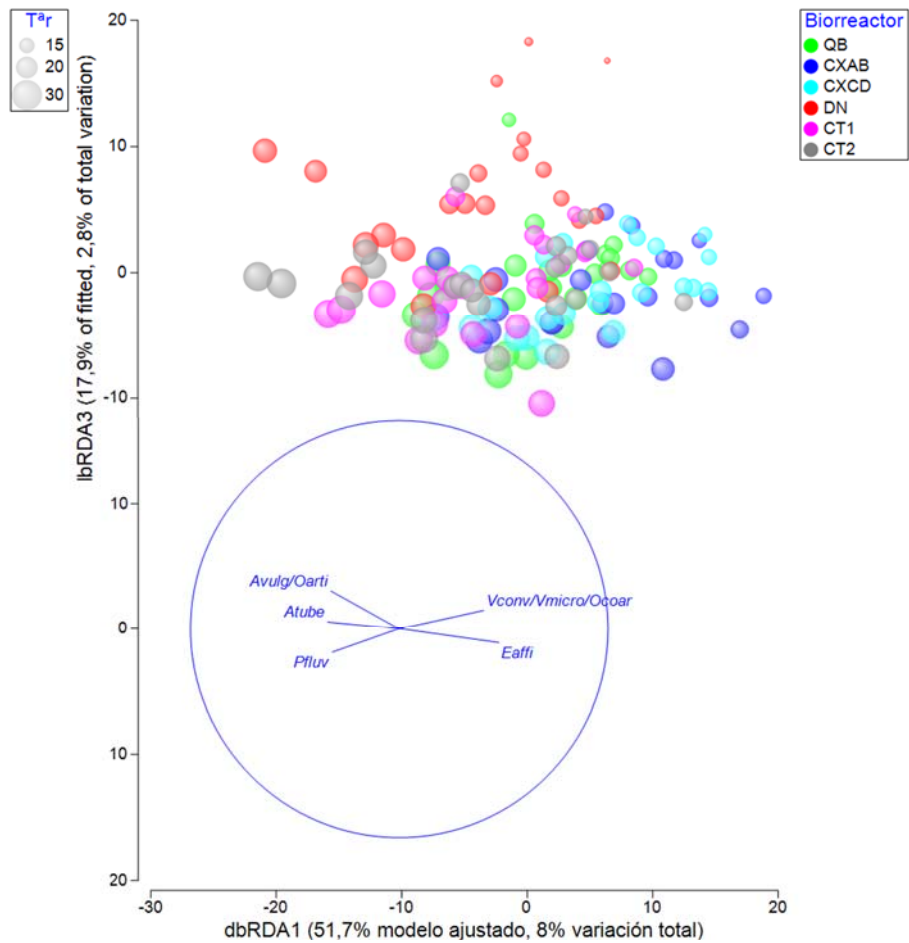


Figura 4.49. Gráfico de burbujas de la T^{ar} en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables FQLM y la densidad de protistas y metazoos en la matriz total. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,30 y -0,30.

b) Modelos de ordenación e interpretación ambiental a partir de las variables fisicoquímicas del afluente (FQAF)

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de variables FQAF del biorreactor QB indican una correlación positiva de la CAG con el dbRDA1 y negativa de la CNi con el dbRDA2 (tabla 4.40). *Euplotes affinis* se revela como el organismo más relacionado ($r=0,51$) con elevada CAG, mientras que *P. trichophorum*, *Lecane* sp. y los gastrotricos lo hacen ($r>-0,50$) con baja CAG. En el dbRDA2, *U. nigricans* se encuentra relacionado ($r=-0,52$) con elevada CNi, mientras que las amebas pequeñas lo hacen ($r=0,59$) con bajos valores de esta variable.

Tabla 4.40. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQAF y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbRDA en QB.

Biorreactor	VARIABLES	dbRDA1	dbRDA2
QB	CAG	0,786	0,619
	CNi	0,619	-0,786
	<i>P. trichophorum</i>	-0,65	-0,28
	<i>Euglypha</i> sp.	-0,44	0,03
	Amebas pequeñas	-0,11	0,59
	<i>Coleps hirtus</i>	-0,47	0,08
	<i>T. quadripartita</i>	0,09	-0,35
	<i>A. tuberosa</i>	-0,27	-0,37
	<i>U. nigricans</i>	0,20	-0,52
	<i>E. affinis</i>	0,51	-0,38
	<i>P. fluviatilis</i>	-0,41	0,03
	<i>T. minuta</i>	-0,38	-0,19
	<i>E. chrysemidis</i>	-0,43	0,13
	<i>V. microstoma</i>	0,58	-0,24
	<i>Rotaria</i> sp.	-0,37	0,17
	<i>Lecane</i> sp.	-0,55	-0,43
	<i>A. variegatum</i>	-0,41	-0,13
	Gastrotricos	-0,61	-0,04

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de variables FQAF del biorreactor CXCD indican una elevada correlación positiva de la CPT con el dbRDA1 y negativa, también elevada, de la CProt y CAG con el dbRDA2 y dbRDA3, respectivamente (tabla 4.41). Los protistas y metazoos que se relacionan ($r>0,40$) de forma significativa con elevados valores de la CPT son los siguientes: *O. coarctata*, *T. minuta* y *E. affinis*. El diagrama de burbujas de la CPT expresado en la figura del dbRDA indica que la abundancia de dichos organismos se encuentra influenciada por valores de la CPT superiores a 15 g/Kg SSVLM.d (figura 4.50). Contrariamente, son numerosos los organismos que se relacionan de forma negativa con valores inferiores de la CPT, presentando los mayores coeficientes de correlación ($r>-0,80$) los siguientes organismos: *P. trichophorum*, *Periacineta* sp., *E. plicatilis* y *A. tuberosa*. En el eje dbRDA2, destaca la relación directa encontrada de *Bodo saltans* ($r=-0,62$) e inversa de *E. affinis* ($r=0,43$) con la CProt. Respecto al eje dbRDA3, destaca la relación directa encontrada de *L. lamella* ($r=-0,44$) e inversa de *M. elegans* (0,50) con la CAG.

Tabla 4.41. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQAF y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbRDA en CXCD.

CXCD	CPT	0,934	0,164	-0,317
	CAG	-0,351	0,256	-0,901
	CProt	0,067	-0,953	-0,297
	<i>Bodo saltans</i>	-0,01	-0,62	-0,08
	<i>P. trichophorum</i>	-0,82	-0,04	0,09
	<i>E. sulcatum</i>	-0,78	-0,12	-0,03
	<i>A. vulgaris</i>	-0,58	0,12	0,11
	<i>P. operculata</i>	-0,39	0,12	0,29
	<i>Centropyxis</i> sp.	-0,42	0,20	0,37
	Amebas grandes	-0,74	-0,11	-0,23
	Amebas pequeñas	-0,55	0,13	-0,22
	<i>L. lamella</i>	-0,35	-0,34	-0,44
	<i>A. punctatus</i>	-0,59	-0,08	0,16
	<i>A. tuberosa</i>	-0,86	-0,06	-0,06
	<i>M. elegans</i>	-0,41	0,33	0,50
	<i>Periacineta</i> sp.	-0,80	-0,10	-0,04
	<i>Trichophrya</i> sp.	-0,13	0,18	-0,37
	<i>U. nigricans</i>	-0,53	-0,09	-0,05
	<i>E. affinis</i>	0,40	0,43	-0,07
	<i>P. fluviatilis</i>	-0,72	-0,10	-0,19
	<i>T. minuta</i>	0,55	-0,02	-0,32
	<i>G. membranaceus</i>	-0,60	0,11	-0,03
	<i>O. articulata</i>	-0,48	0,10	0,01
	<i>E. plicatilis</i>	-0,80	-0,11	-0,13
	<i>E. balatonica</i>	-0,62	-0,24	-0,24
	<i>V. aquadulcis</i>	0,22	-0,44	0,08
	<i>V. convallaria</i>	0,31	-0,39	0,36
	<i>V. infusionum</i>	0,18	0,39	-0,36
	<i>O. coarctata</i>	0,85	-0,13	0,01
	<i>Rotaria</i> sp.	-0,75	-0,02	-0,07
	<i>Lecane</i> sp.	-0,77	-0,09	0,01

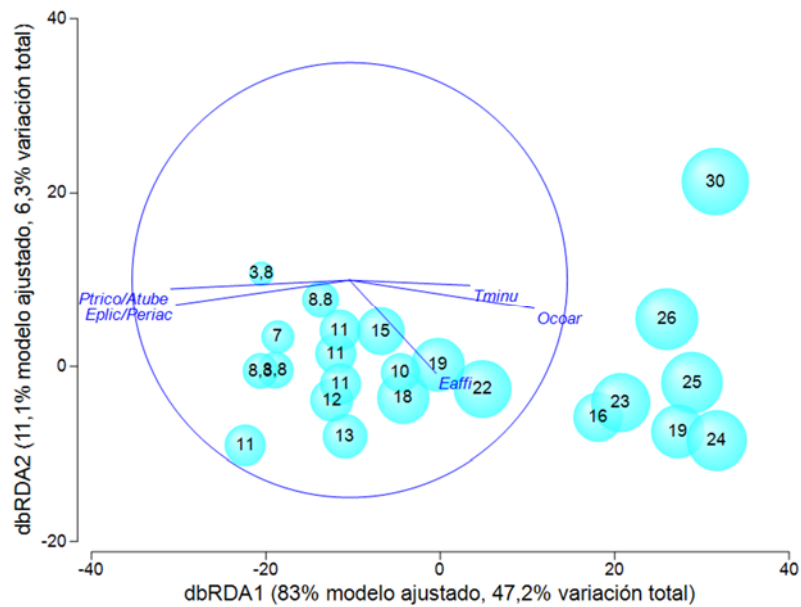


Figura 4.50. Gráfico de burbujas de la CPT en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables FQAF y protistas y metazoos en CXCD. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson > -0,80 y 0,40.

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de variables FQAF del biorreactor CT2 indican una elevada correlación positiva del %DQOs y la DBO₅/PT con el dbRDA1 y dbRDA2, respectivamente, y una correlación negativa elevada de la DBO₅/NT con el dbRDA3 (tabla 4.42). Los protistas y metazoos que se relacionan ($r > 0,40$) de forma significativa con elevados valores del %DQOs son: *U. nigricans*, *G. membranaceus* y *C. polypinum*. El diagrama de burbujas del %DQOs expresado en la figura del dbRDA indica que la abundancia de dichos organismos se encuentra influenciada por valores del %DQOs superiores al 40%, aproximadamente (figura 4.51). De forma contraria, las amebas desnudas pequeñas, *A. punctatus*, *A. tuberosa* y *V. infusionum* parecen encontrarse asociados ($r > -0,40$) con valores inferiores a los ya mencionados. En el eje dbRDA2, destaca la relación directa encontrada de *A. vulgaris* ($r = 0,64$) y *O. articulata* ($r = 0,44$), e inversa de *E. balatonica* ($r = -0,44$) con la DBO₅/PT. Respecto al eje dbRDA3, destaca la relación directa encontrada de *V. aquadulcis* ($r = -0,43$) e inversa de *V. microstoma* ($r = 0,41$) con la DBO₅/NT.

Tabla 4.42. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQAF y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbRDA en CT2.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3
CT2	%DQOs	0,864	-0,370	0,343
	DBO₅/PT	0,462	0,852	-0,246
	DBO₅/NT	0,201	-0,371	-0,907
	<i>Bodo saltans</i>	0,13	-0,41	-0,26
	<i>A. vulgaris</i>	-0,15	0,64	0,09
	Amebas grandes	0,38	0,002	0,37
	Amebas pequeñas	-0,50	-0,16	0,27
	<i>A. punctatus</i>	-0,59	0,22	0,03
	<i>A. tuberosa</i>	-0,40	-0,06	0,03
	<i>Periacineta</i> sp.	-0,35	-0,14	0,31
	<i>U. nigricans</i>	0,45	0,03	0,24
	<i>A. cicada</i>	-0,05	-0,37	0,25
	<i>P. fluviatilis</i>	-0,35	0,16	-0,10
	<i>T. minuta</i>	-0,38	-0,16	-0,27
	<i>G. membranaceus</i>	0,61	-0,02	0,002
	<i>A. uncinata</i>	-0,34	-0,39	0,12
	<i>O. articulata</i>	-0,31	0,49	0,21
	<i>E. balatonica</i>	-0,18	-0,44	-0,13
	<i>V. aquadulcis</i>	0,12	0,28	-0,43
	<i>V. convallaria</i>	0,38	0,02	0,03
	<i>Pseudovorticella</i> sp.	0,37	-0,17	-0,05
	<i>C. polypinum</i>	0,46	-0,25	0,16
	<i>V. microstoma</i>	-0,02	-0,09	0,41
	<i>V. infusionum</i>	-0,46	-0,12	0,32
	<i>Rotaria</i> sp.	0,08	0,37	-0,21
	<i>Lecane</i> sp.	-0,21	0,44	-0,03
	Nematodos	-0,15	-0,18	0,36

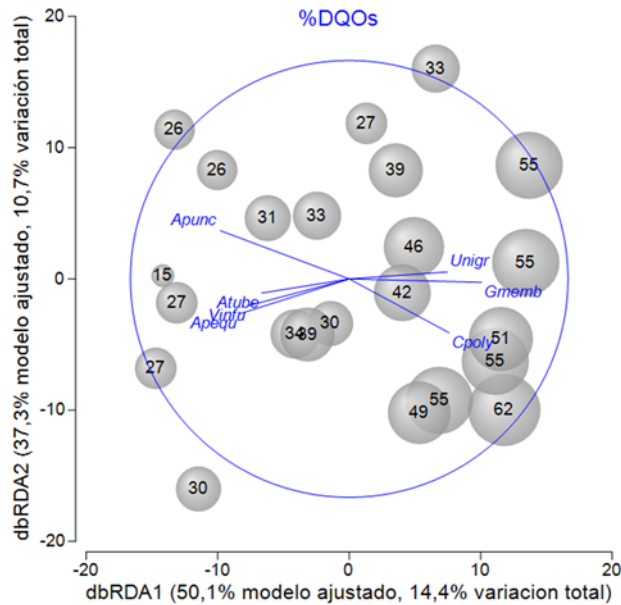


Figura 4.51. Gráfico de burbujas del %DQOs en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables FQAF y la densidad de protistas y metazoos en CT2. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de -0,40 y 0,40.

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de variables FQAF de la matriz total indican una correlación negativa elevada de la CPT y del %DQOs con el eje dbRDA1 y dbRDA2, respectivamente, y positiva de la CAG con el eje dbRDA4 (tabla 4.43). La variable DBO₅/PT no presenta coeficientes de correlación elevados en ninguno de los ejes extraídos del dbRDA. El número de organismos y sus coeficientes de correlación son bajos respecto a los modelos individuales de los diferentes biorreactores. Los protistas y metazoos que se relacionan ($r > 0,30$) de forma significativa con bajos valores de la CPT en el dbRDA1 son los siguientes: *P. trichophorum*, *E. sulcatum*, *A. vulgaris*, amebas desnudas grandes, *A. tuberosa*, *T. minuta*, *O. articulata*, *E. plicatilis*, *Rotaria* sp. y *Lecane* sp. El diagrama de burbujas de la CPT expresado en la figura del dbRDA indica que la abundancia de dichos organismos se encuentra influenciada por valores de la CPT inferiores a 15 g/Kg SSVLM.d, aproximadamente (figura 4.52). De forma contraria, *V. aquadulcis*, *O. coarctata* y *V. infusionum* parecen encontrarse asociados ($r > 0,30$) con valores superiores. En el caso del dbRDA2, *E. affinis*, *T. minuta* y *O. coarctata* se relacionan de forma inversa ($r > 0,40$) con el %DQOs, mientras que de forma directa lo hacen con la DBO₅/PT.

Tabla 4.43. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQAF y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbRDA en la matriz total.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3	dbRDA4
Matriz total	CPT	-0,869	0,311	-0,337	-0,184
	DBO₅/PT	0,491	0,583	-0,516	-0,391
	CAG	0,052	-0,123	-0,654	0,744
	%DQOs	0,013	-0,740	-0,439	-0,509
	<i>P. trichophorum</i>	0,44	0,02	0,04	0,01
	<i>E. sulcatum</i>	0,51	0,04	0,03	-0,05
	<i>A. vulgaris</i>	0,30	-0,26	0,16	0,11
	<i>A. grandes</i>	0,41	0,07	-0,38	-0,04
	<i>A. tuberosa</i>	0,37	-0,05	-0,20	0,03
	<i>E. affinis</i>	-0,20	0,42	-0,12	-0,09
	<i>T. minuta</i>	0,30	0,38	0,24	-0,02
	<i>V. aquadulcis</i>	-0,31	0,11	0,16	0,13
	<i>V. microstoma</i>	-0,17	-0,02	-0,10	0,31
	<i>V. infusionum</i>	-0,30	0,14	-0,06	0,25
	<i>O. articulata</i>	0,36	-0,06	0,006	0,004
	<i>E. plicatilis</i>	0,37	0,06	-0,31	-0,06
	<i>O. coarctata</i>	-0,37	0,46	0,005	-0,03
	<i>Rotaria</i> sp.	0,50	0,02	-0,07	0,05
	<i>Lecane</i> sp.	0,56	0,08	-0,04	-0,003

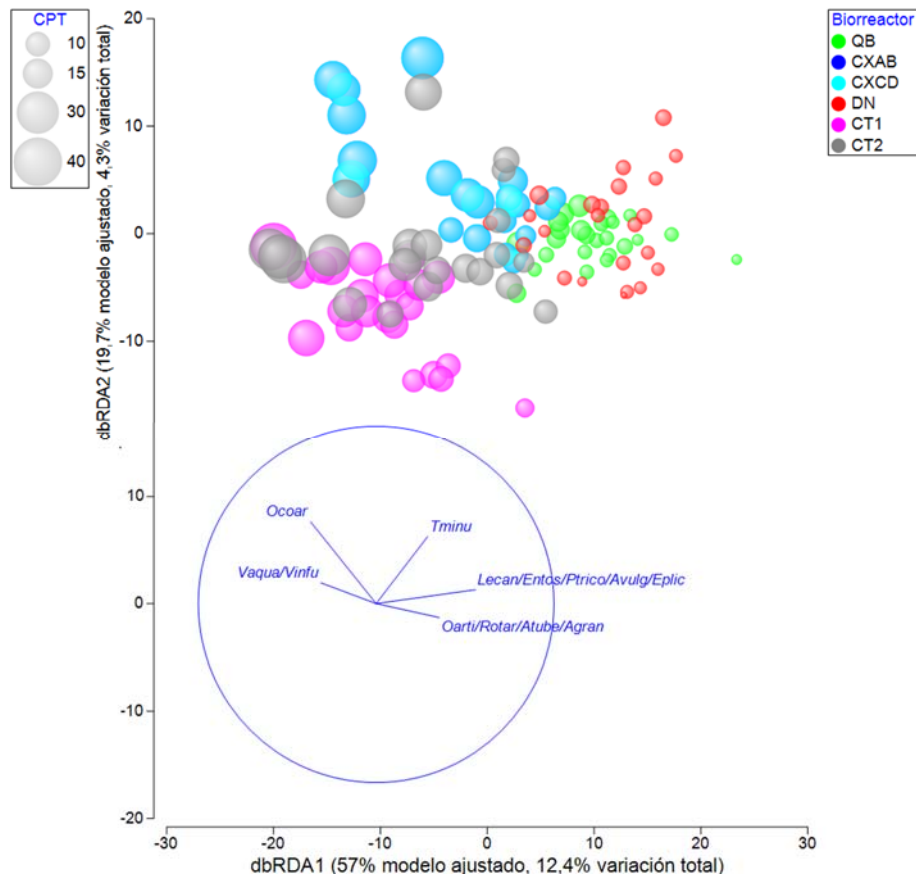


Figura 4.52. Gráfico de burbujas de la CPT en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables FQAF y la densidad de protistas y metazoos en la matriz total. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,30 y -0,30.

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de interpretación ambiental que incluye todas las variables (OPE, FQLM y FQAF) de la matriz total indican una elevada correlación negativa de la CPT con el eje dbRDA1, y una correlación moderada positiva y negativa de la T^ar y del %SSVLM, respectivamente, con el eje dbRDA2 (tabla 4.44). La variable CAG muestra un coeficiente de correlación negativo moderado-alto con el dbRDA5, cuyo eje explica tan solo el 1,73% de la variabilidad biológica, mientras que el resto de variables muestran coeficientes de correlación muy bajos. Los coeficientes de correlación de las distintas especies de protistas y metazoos son menores respecto a los modelos individuales de los diferentes biorreactores. Los protistas y metazoos que se relacionan ($r > 0,30$) de forma significativa con bajos valores de la CPT en el dbRDA1 son: *P. trichophorum*, *E. sulcatum*, *A. vulgaris*, amebas desnudas grandes y pequeñas, *A. tuberosa*, *A. uncinata*, *T. minuta*, *O. articulata*, *Rotaria* sp., *Lecane* sp. y *E. plicatilis*. El diagrama de burbujas de la CPT expresado en la figura del dbRDA indica que valores de la CPT inferiores a 15 g/Kg SSVLM.d influyen sobre la abundancia de dichos organismos (figura 4.53). Contrariamente, *A. cicada*, *V. aquadulcis* y *O. coarctata* parecen encontrarse asociados ($r > -0,30$) con valores más altos. Por último, los organismos relacionados ($r > -0,30$) en el dbRDA2 con valores bajos de la T^ar y altos del %SSVLM son los siguientes: *E. affinis*, *T. minuta*, *V. convallaria*, *V. microstoma*, *V. infusionum*, *C. polypinum* y *O. coarctata*.

Tabla 4.44. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables OPE, FQLM y FQAF, y correlaciones de Pearson de protistas y metazoos con los ejes del dbRDA en la matriz total.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3	dbRDA4	dbRDA5
Matriz total	CPT	-0,794	-0,110	-0,102	-0,438	-0,394
	CO₃	-0,541	0,513	0,336	0,452	0,356
	T^ar	0,256	0,600	0,504	-0,587	-0,150
	%SSVLM	-0,092	-0,623	0,619	-0,203	0,422
	CAG	0,060	-0,166	0,484	0,467	-0,719
	<i>P. trichophorum</i>	0,53	-0,04	0,05	-0,07	0,04
	<i>E. sulcatum</i>	0,51	-0,14	0,06	0,03	0,19
	<i>A. vulgaris</i>	0,39	0,19	-0,16	0,13	-0,11
	Amebas grandes	0,43	-0,28	0,24	0,08	-0,02
	Amebas pequeñas	0,31	-0,28	-0,04	0,01	-0,17
	<i>A. tuberosa</i>	0,50	0,11	-0,06	-0,14	0,01
	<i>A. cicada</i>	-0,30	0,04	0,08	0,17	0,12
	<i>E. affinis</i>	-0,23	-0,54	0,09	-0,20	0,11
	<i>T. minuta</i>	0,19	-0,30	-0,38	0,09	0,12
	<i>A. uncinata</i>	0,30	-0,21	-0,20	-0,11	-0,18
	<i>V. aquadulcis</i>	-0,30	-0,08	0,31	-0,17	-0,09
	<i>V. convallaria</i>	-0,06	-0,42	-0,08	-0,01	0,16
	<i>V. microstoma</i>	-0,19	-0,36	0,03	0,23	-0,22
	<i>V. infusionum</i>	-0,19	-0,35	-0,10	0,01	-0,33
	<i>C. polypinum</i>	0,01	-0,30	0,30	0,03	-0,11
	<i>O. articulata</i>	0,43	0,13	-0,12	0,08	-0,13
	<i>O. coarctata</i>	-0,40	-0,52	-0,11	-0,19	0,01
	<i>E. plicatilis</i>	0,42	-0,26	0,38	-0,08	0,11
	<i>Rotaria</i> sp.	0,53	0,07	0,07	0,05	-0,03
	<i>Lecane</i> sp.	0,56	-0,14	0,18	0,01	0,17

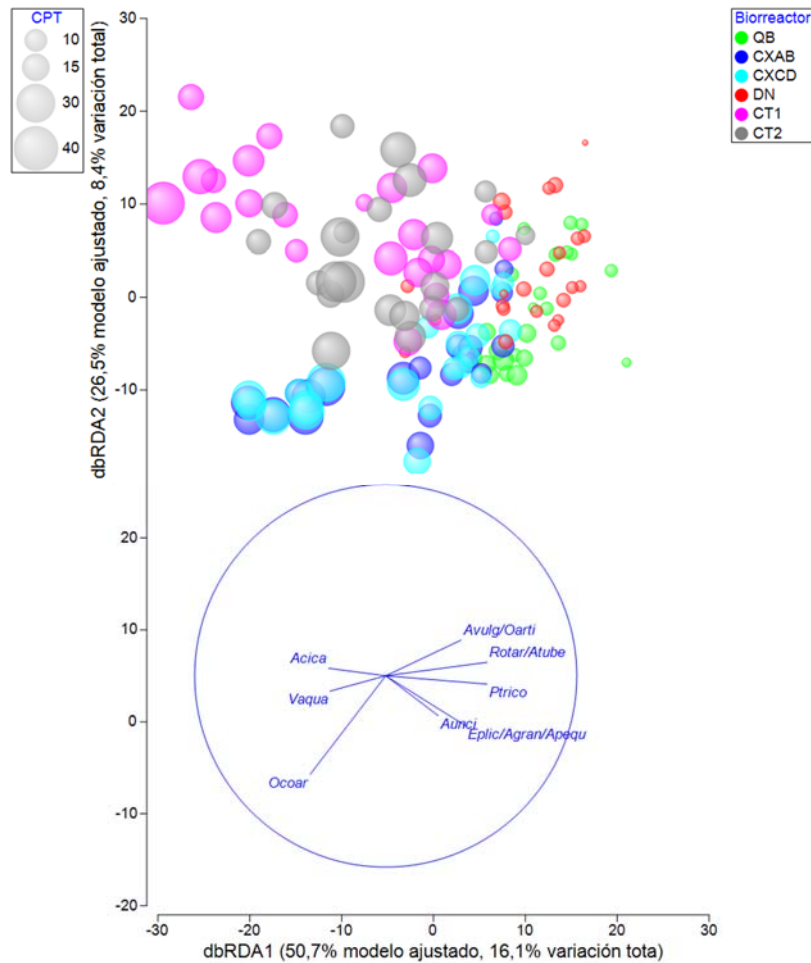


Figura 4.53. Gráfico de burbujas de la CPT en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables OPE, FQLM y FQAF, y la densidad de protistas y metazoos en la matriz total. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,30 y -0,30.

Descripción de los modelos de interpretación ambiental basados en el análisis de correspondencias canónico

La longitud del gradiente de la matriz biológica determinada a través de la rutina DCA en los diferentes biorreactores y sus combinaciones ha permitido determinar la conveniencia de elegir un modelo unimodal para la interpretación ambiental de protistas y metazoos a partir del análisis de correspondencias canónico (CCA) (tabla 4.45). En el caso de los biorreactores CXAB y CXCD, se ha utilizado la combinación de ambos (CX) debido a que se obtuvieron resultados similares en la construcción de los modelos a partir de la rutina DISTLM. En el caso de la EDAR CT, debido a los diferentes resultados encontrados, los biorreactores han sido explorados individualmente (CT1 y CT2).

Los resultados indican que la longitud del gradiente en la matriz total, CT1 y CX es adecuada ($>1,5$ SD) para la exploración de los modelos a partir del CCA.

Tabla 4.45. Resultados de la rutina DCA a partir de la densidad de protistas y metazoos.

Biorreactor	Ejes	1	2	3	4	Inercia total
TOTAL	Valores propios	0,130	0,059	0,046	0,036	0,731
	Longitud del gradiente	1,786	1,577	1,107	0,958	
	% varianza acumulada por las v. biológicas	18	26	32,5	37,3	
QB	Valores propios	0,117	0,062	0,040	0,024	0,684
	Longitud del gradiente	1,305	1,202	1,188	0,719	
	% varianza acumulada por las v. biológicas	17,2	26,2	32,1	35,6	
CX	Valores propios	0,203	0,046	0,029	0,019	0,606
	Longitud del gradiente	1,608	0,955	1,245	0,873	
	% varianza acumulada por las v. biológicas	33,5	41,1	46,0	49,2	
DN	Valores propios	0,096	0,037	0,018	0,010	0,386
	Longitud del gradiente	0,998	0,917	0,699	0,561	
	% varianza acumulada por las v. biológicas	24,9	34,6	39,2	41,9	
CT1	Valores propios	0,161	0,077	0,053	0,026	0,690
	Longitud del gradiente	1,733	1,268	1,368	1,051	
	% varianza acumulada por las v. biológicas	23,3	34,4	42,1	45,9	
CT2	Valores propios	0,121	0,056	0,032	0,022	0,592
	Longitud del gradiente	1,110	0,969	1,000	0,865	
	% varianza acumulada por las v. biológicas	20,4	29,9	35,3	39,1	

a) Modelos de interpretación ambiental a partir de las variables operacionales (OPE)

Los valores del VIF de las variables OPE en CX se encuentran por debajo de 10 SD, indicando una bajo nivel de redundancia. El nivel de significación de las variables ha sido calculado de forma manual con la rutina *forward selection*, empleando el test de Montecarlo con 999 permutaciones. Las variables CM, TRHds, R.rec, ODb, ODm y ODa han sido excluidas del modelo por presentar un nivel de significación mayor de 0,05.

A partir del CCA entre variables OPE y variables biológicas en CX han sido extraídos nuevos ejes canónicos. Los dos primeros ejes explican el 25,9% de la variabilidad en la abundancia de las poblaciones de protistas y metazoos, siendo el 84,6% de esta explicada por las variables OPE (tabla 4.46). El primer eje canónico muestra un elevado coeficiente de correlación entre variables biológicas y OPE. Además, el primer eje se encuentra alta y positivamente correlacionado con la EF, mientras que el segundo, tercero y cuarto lo hacen de forma negativa con los SSLM, la CMDQOs y el TRHr, respectivamente. El resultado del pCCA muestra el *ranking* en orden decreciente de la variabilidad biológica explicada por cada una de las siguientes variables: EF (10,7%)>SSLM (3,5%)>TRHr (2,2%)>CMDQOs (1,8%). La variabilidad explicada restante (0,4%) no está definida por ninguna variable en particular y quedaría explicada por el conjunto de todas ellas.

Tabla 4.46. Resultados del CCA entre las variables OPE y protistas y metazoos en CX.

Ejes	1	2	3	4	Inercia total	
Valores propios	0,134	0,023	0,018	0,011	0,606	
Correlaciones v. biológicas-v. ambientales	0,824	0,663	0,687	0,578		
Porcentaje de la varianza explicada						
por las v. biológicas	22,2	25,9	28,9	30,6		
por la relación v. biológicas-v. ambientales	72,4	84,6	94,3	100,0		
Suma de todos los valores propios canónicos					0,186	
Variables ambientales seleccionadas	Correlaciones de Pearson (r)				Test de Montecarlo	
					F p-valor	
EF	0,8989	0,3282	0,2320	0,1739	10,015	0,0010
CMDQOs	-0,3906	0,0914	-0,8876	0,2262	1,799	0,0370
TRHr	0,1377	0,0019	-0,6209	-0,7717	2,111	0,0130
SSLM	0,2664	-0,8386	0,4488	-0,1562	3,061	0,0010

El CCA entre variables OPE y protistas y metazoos en CX ha permitido aproximar los valores óptimos de la EF para cada uno de los diferentes organismos (figura 4.54). Los protistas y metazoos que se encuentran influenciados por valores elevados de la EF, en orden decreciente según su valor óptimo, son los siguientes: *M. elegans*>*P. operculata*>*A. punctatus*≈*Periacineta* sp.≈*E. sulcatum*>*O. articulata*≈*A. tuberosa*>*E. plicatilis*≈*Rotaria* sp.≈*P. trichophorum*. Aquellos organismos que se encuentran influenciados por valores bajos de la EF son: *O. coarctata*>*T. minuta*≈*E. affinis*≈*V. infusionum*≈*Trichophrya* sp.>*V. convallaria*≈*L. lamella*.

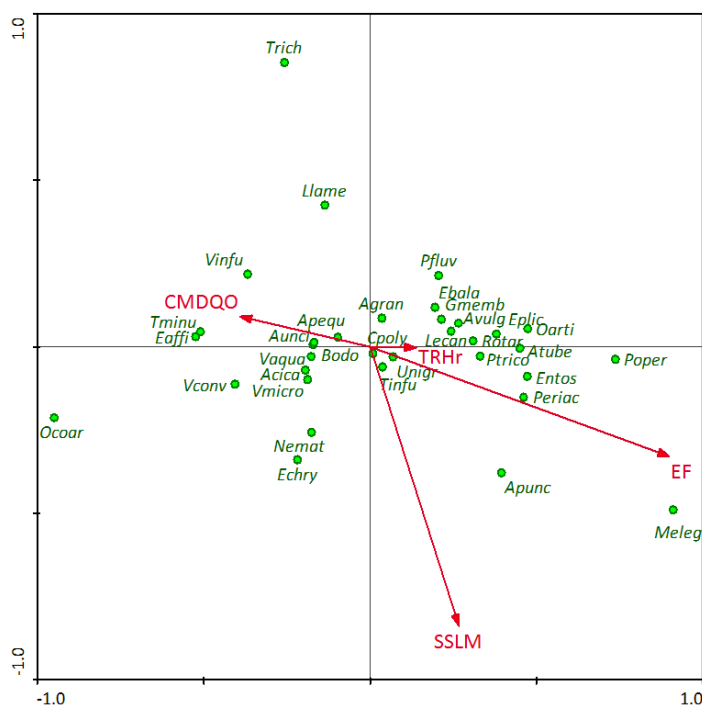


Figura 4.54. Biplot del CCA representando la relación entre variables OPE y protistas y metazoos en CX.

Los valores del VIF de las variables OPE en CT1 se encuentran por debajo de 20 SD, a excepción del TRHr y TRHds (20). Esta última variable se eliminó debido a su exclusión en el DISTLM de CT1. Las variables ODM, ODa, R.rec, EF, CMDQOs, CM y SSLM han sido excluidas del modelo por presentar un nivel de significación mayor de 0,05.

A partir del CCA entre variables OPE y biológicas en CT1 han sido extraídos nuevos ejes canónicos. Los dos primeros ejes explican el 24,4% de la variabilidad de la abundancia de las poblaciones de protistas y metazoos, siendo el 79,5% de esta explicada por las variables OPE (tabla 4.47). Los tres ejes extraídos muestran coeficientes de correlación elevados entre variables biológicas y variables OPE. Los valores de correlación más elevados de las variables con el primer eje canónico corresponden a la CO₃ y el TRHr, mientras que de forma moderada lo hace el ODb con el primer y segundo eje. El resultado del pCCA muestra el *ranking* en orden decreciente de la variabilidad biológica explicada por cada una de las siguientes variables: CO₃ (5,8%)>TRHr (5,6%)>ODb (5,3%). La variabilidad explicada restante (4,5%), no definida por ninguna variable en particular, quedaría explicada por el conjunto de todas ellas.

Tabla 4.47. Resultados del CCA entre variables OPE y protistas y metazoos en CT1.						
Ejes	1	2	3	4	Inercia total	
Valores propios	0,116	0,053	0,043	0,085	0,690	
Correlaciones v. biológicas-v. ambientales	0,885	0,856	0,815	-		
Porcentaje de la varianza explicada						
por las v. biológicas	16,8	24,4	30,7	43,1		
por la relación v. biológicas-v. ambientales	54,7	79,5	100	-		
Suma de todos los valores propios canónicos						0,212
Variables ambientales seleccionadas	Correlaciones de Pearson (r)				Test de Montecarlo	
					F	p-valor
CO ₃	0,8999	-0,0074	-0,4361	-	3,645	0,0020
TRHr	-0,8677	0,1388	-0,4772	-	2,146	0,0100
ODb	0,6801	0,7177	0,1499	-	2,096	0,0080

El CCA entre variables OPE y protistas y metazoos en CT1 ha permitido aproximar los valores óptimos del TRHr de cada uno de los diferentes organismos (figura 4.55). Los protistas y metazoos que se encuentran influenciados por valores elevados del TRHr, en orden decreciente según su valor óptimo, son los siguientes: *O. articulata*≈*gastrotricos*≈*P. fluviatilis*>*C. polypinum*≈*P. trichophorum*≈*E. chrysemidis*≈*V. infusionum*>*E. balatonica*≈*A. vulgaris*≈*U. uncinata*. Aquellos organismos que se encuentran influenciados por valores bajos del TRHr y elevados de la CO₃ corresponden a: *T. infusionum*>*G. membranaceus*≈*U. nigricans*>*V. aquadulcis*≈*A. cicada*.

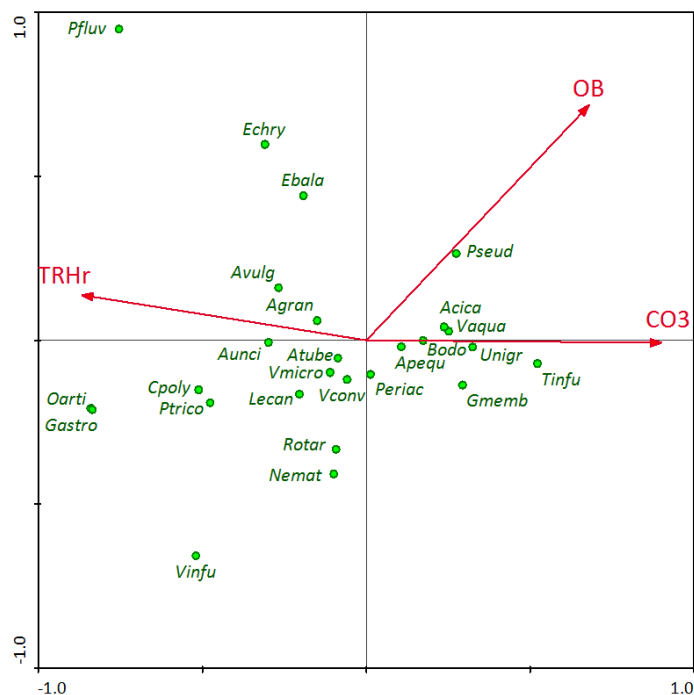


Figura 4.55. Biplot del CCA representando la relación entre variables OPE y protistas y metazoos en CT1.

Los valores del VIF de las variables OPE en la matriz total se encuentran por debajo de 10 SD, indicando un bajo nivel de redundancia. Las variables ODM, ODA y R.rec han sido excluidas del modelo por presentar un nivel de significación mayor de 0,05.

A partir del CCA entre variables OPE y variables biológicas en la matriz total han sido extraídos nuevos ejes canónicos, cuyos dos primeros ejes explican el 13,6% de la variabilidad de la abundancia de protistas y metazoos, siendo el 69% de esta explicada por las variables OPE (tabla 4.48). Los dos primeros ejes muestran coeficientes de correlación moderados entre variables biológicas y variables OPE. Los valores de correlación más elevados de las variables con los ejes canónicos corresponden a la EF con el primer eje y SSLM con el segundo eje, mientras que de forma moderada lo hace la CM con el primer eje y el TRHds y ODb con el segundo eje. El resultado del pCCA muestra el *ranking* en orden decreciente de la variabilidad biológica explicada por cada una de las siguientes variables: EF (2,8%)>TRHr (1,2%)=CO₃ (1,2%)>CM (1,0%)>CMDQOs (0,9%)>ODb (0,8%)>SSLM (0,7%)>TRHds (0,6%). La variabilidad explicada restante, no definida por ninguna variable en particular y que quedaría explicada por el conjunto de todas ellas, sería del 5,5%.

Tabla 4.48. Resultados del CCA entre variables OPE y protistas y metazoos en la matriz total.

Ejes	1	2	3	4	Inercia total	
Valores propios	0,061	0,040	0,014	0,012	0,743	
Correlaciones v. biológicas-v. ambientales	0,729	0,736	0,554	0,584		
Porcentaje de la varianza explicada						
por las v. biológicas	8,3	13,6	15,6	17,2		
por la relación v. biológicas-v. ambientales	41,8	69,0	78,7	87,1		
Suma de todos los valores propios canónicos					0,147	
Variables ambientales seleccionadas	Correlaciones de Pearson (r)				Test de Montecarlo	
					F	
					p-valor	
EF	-0,8877	0,3511	-0,0027	0,0119	10,755	0,0010
SSLM	0,0488	0,8606	-0,1951	-0,0594	6,635	0,0010
TRHr	-0,6259	-0,1157	-0,5941	0,4070	3,148	0,0020
CO ₃	0,4370	0,5778	0,2053	0,5676	2,975	0,0010
TRHds	-0,0086	-0,7611	0,2333	0,0439	2,001	0,0130
CM	0,7146	-0,4300	0,0737	-0,1872	1,611	0,0460
CMDQOs	0,6809	0,0038	0,2653	0,1013	1,822	0,0200
ODb	-0,1722	0,7393	-0,5472	0,0877	1,711	0,0250

El CCA que relaciona las variables OPE y protistas y metazoos a partir de la matriz total ha permitido aproximar los valores óptimos de la EF de cada uno de los diferentes organismos (figura 4.56). Los vectores que representan las variables EF y CM forman aproximadamente un ángulo de 180°, indicando una relación inversa. Los protistas y metazoos que se encuentran influenciados por valores elevados de la EF y bajos de la CM, en orden decreciente según sus valores óptimos, son los siguientes: *P. operculata* > *E. sulcatum* > *O. articulata* ≈ *A. tuberosa* > *E. plicatilis* ≈ *Rotaria* sp. ≈ *Lecane* sp. ≈ *P. trichophorum*. Aquellos organismos que se encuentran influenciados por valores bajos de la EF y altos de la CM son: *O. coarctata* > *E. affinis* > *V. infusioinum* > *C. polypinum* ≈ *L. lamella* ≈ *T. infusioinum*.

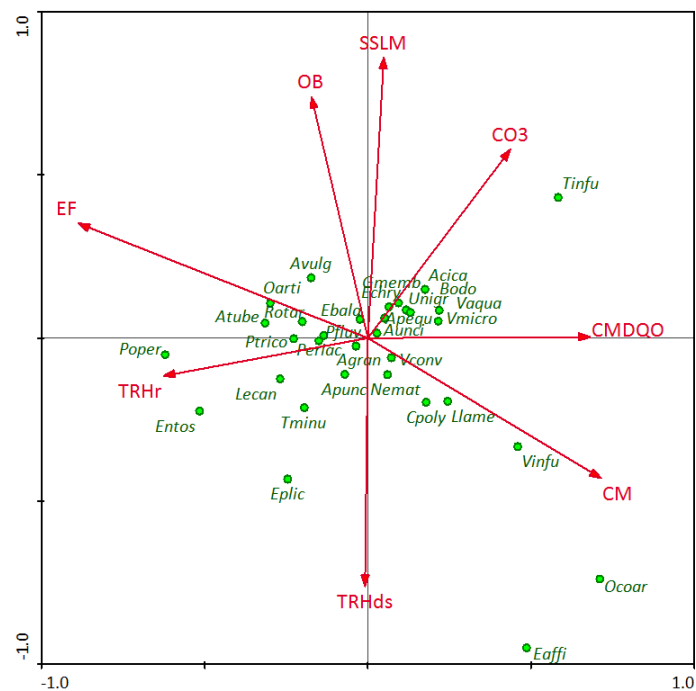


Figura 4.56. Biplot del CCA representando la relación entre variables OPE y protistas y metazoos en la matriz total.

b) Modelos de interpretación ambiental a partir de las variables fisicoquímicas del licor mezcla (FQLM)

Los valores del VIF de las variables FQLM en el biorreactor CX se encuentran por debajo de 10 SD, a excepción del IVF30 e IVF5 (15 SD), indicando un bajo nivel de redundancia. Las variables pHLM, %SSVLM, IVF5 y DQOLM han sido excluidas del modelo por presentar un nivel de significación mayor de 0,05.

A partir del CCA entre variables FQLM y variables biológicas en CX han sido extraídos nuevos ejes canónicos, cuyos dos primeros ejes explican el 32,2% de la variabilidad de la abundancia de protistas y metazoos, siendo el 82% de esta explicada por las variables FQLM (tabla 4.49). El primer eje canónico muestra una elevada correlación entre variables biológicas y variables FQLM, mientras que el resto de ejes canónicos lo hacen de forma moderada. Los valores de correlación más elevados de las variables con los ejes canónicos corresponden al NTLM y la T^ar con el primer eje y el IVF30 con el tercer eje, mientras que de forma moderada lo hace el PTLM y la CondLM con el segundo eje. El resultado del pCCA muestra el *ranking* en orden decreciente de la variabilidad biológica explicada por cada una de las siguientes variables: T^ar (3,1%)>IVF30 (2,7%)=PTLM (2,7%)>CondLM (1,2%)>CM (1,9%)>NTLM (1,7%). La variabilidad explicada restante, no definida por ninguna variable en particular y que quedaría explicada por el conjunto de todas ellas, sería del 9,7%.

Tabla 4.49. Resultados del CCA entre las variables FQLM y protistas y metazoos en CX.						
Ejes	1	2	3	4	Inercia total	
Valores propios	0,168	0,027	0,023	0,013	0,606	
Correlaciones v. biológicas-v. ambientales	0,916	0,743	0,713	0,729		
Porcentaje de la varianza explicada						
por las v. biológicas	27,7	32,2	36,1	38,3		
por la relación v. biológicas-v. ambientales	70,4	82,0	91,8	97,3		
Suma de todos los valores propios canónicos					0,238	
Variables ambientales seleccionadas	Correlaciones de Pearson (r)				Test de Montecarlo	
					F	
					p-valor	
NTLM	0,8833	0,0581	-0,0392	-0,2900	12,375	0,0010
T ^a r	-0,8618	0,1892	0,2247	0,1318	3,134	0,0010
IVF30	0,1430	-0,0576	0,9875	0,0316	2,635	0,0010
PTLM	0,4906	0,7379	-0,3797	0,2348	2,955	0,0010
CondLM	0,3754	-0,7059	0,1970	0,5026	2,095	0,0010

El CCA que relaciona las variables FQLM y protistas y metazoos en CX ha permitido aproximar los valores óptimos de la T^ar y el NTLM de cada uno de los diferentes organismos en el primer eje canónico (figura 4.57). Los vectores que representan las variables T^ar y NTLM forman aproximadamente un ángulo de 180°, indicando una relación inversa. Los protistas y metazoos que se encuentran influenciados por valores elevados de la T^ar y bajos del NTLM, en orden decreciente según sus valores óptimos, son los siguientes: *P. operculata*>*A. punctatus*>*O. articulata*≈*M. elegans*>*E. plicatilis*≈*Periacineta* sp.≈*A. tuberosa*≈*E. sulcatum*>*A. vulgaris*≈*Rotaria* sp.≈*P. fluvialilis*>*T. infusioinum*≈*P. trichophorum*. Aquellos organismos que se encuentran influenciados por valores bajos de la T^ar y altos del NTLM son:

O. coarctata>*E. affinis*>*V. infusionum*>*T. minuta*>*V. microstoma*≈*V. infusionum*>nematodos≈*E. chrysemidis*>*Bodo saltans*≈*A. cicada*≈*A. aquadulcis*. Valores elevados de la variable PTLM, representada en el segundo eje, se relacionan con *V. infusionum*, *T. infusionum* y *Trichophrya* sp., mientras que valores elevados de la variable IVF30, representada en el tercer eje canónico, parecen tener una influencia significativa sobre *L. lamella*.

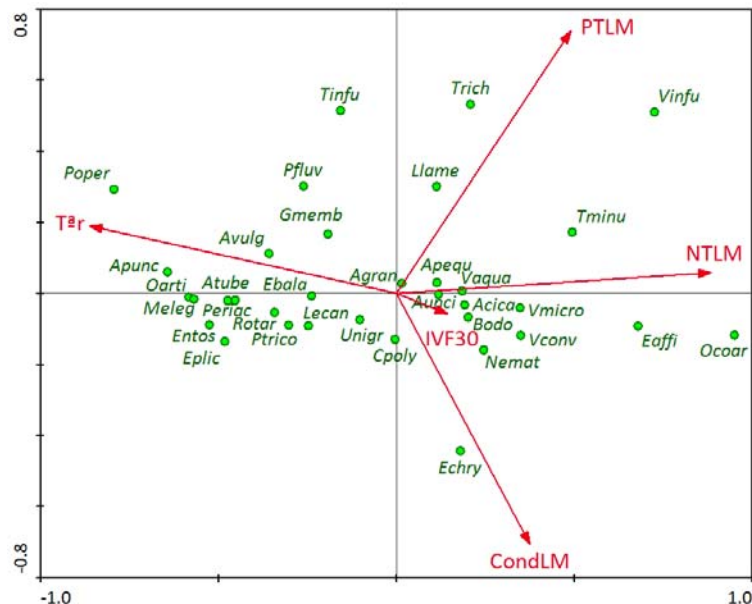


Figura 4.57. Biplot del CCA representando la relación entre variables FQLM y protistas y metazoos en CX.

Los valores del VIF de las variables FQLM en el biorreactor CT1 se encuentran por debajo de 10 SD, a excepción del IVF30 e IVF5 (>20 SD), eliminando por ello del modelo esta última. El resto de variables no han podido ser incluidas en el modelo por presentar un nivel de significación mayor de 0,05.

Los valores del VIF de las variables FQLM en la matriz total se encuentran por debajo de 10 SD, a excepción del IVF30 e IVF5 (>20 SD), eliminando por ello del modelo esta última. Las variables pHLM y DQOLM han sido excluidas del modelo por presentar un nivel de significación mayor de 0,05, mientras que la variable PTLM ha sido excluida por los motivos indicados anteriormente en la construcción de su modelo correspondiente a partir de la rutina DISTLM.

A partir del CCA entre variables FQLM y variables biológicas en la matriz total han sido extraídos nuevos ejes canónicos, cuyos dos primeros ejes explican el 10,3% de la variabilidad de la abundancia de protistas y metazoos, siendo el 75% de esta explicada por las variables FQLM (tabla 4.50). Los dos primeros ejes canónicos muestran una correlación moderada entre variables biológicas y variables FQLM. Los valores de correlación más elevados de las

variables con los ejes canónicos corresponden al %SSVLM, T^ar y NTLM con el primer eje canónico, la T^ar, %SSVLM y CondLM con el segundo eje canónico, e IVF30 con el cuarto eje canónico. El resultado del pCCA muestra el *ranking* en orden decreciente de la variabilidad biológica explicada por cada una de las siguientes variables: T^ar (3,8%)>%SSVLM (3%)>CondLM (1,8%)>NTLM (1,2%)=IVF30 (1,2%). La variabilidad explicada restante, no definida por ninguna variable en particular y que quedaría explicada por el conjunto de todas ellas, sería del 4,2%.

Tabla 4.50. Resultados del CCA entre las variables FQLM y protistas y metazoos en la matriz total.

Ejes	1	2	3	4	Inercia total	
Valores propios	0,051	0,026	0,013	0,009	0,743	
Correlaciones v. biológicas-v. ambientales	0,693	0,654	0,521	0,498		
Porcentaje de la varianza explicada						
por las v. biológicas	6,8	10,3	12,0	13,2		
por la relación v. biológicas-v. ambientales	49,7	75,0	87,7	96,2		
Suma de todos los valores propios canónicos					0,102	
Variables ambientales seleccionadas	Correlaciones de Pearson (r)				Test de Montecarlo	
					F	p-valor
%SSVLM	-0,7655	-0,6000	-0,2150	0,0125	7,775	0,0010
T ^a r	0,6376	-0,6445	-0,2667	0,1254	7,194	0,0010
NTLM	-0,7078	-0,2539	0,1430	0,4180	2,416	0,0030
IVF30	-0,3394	-0,0677	-0,5800	0,6597	2,212	0,0030
CondLM	0,1138	0,7206	-0,6146	-0,2187	1,647	0,0370

El CCA que relaciona las variables FQLM y protistas y metazoos a partir de la matriz total ha permitido aproximar los valores óptimos de la T^ar, %SSVLM, NTLM y PTLM de cada uno de los diferentes organismos en los dos primeros ejes canónicos (figura 4.58). El ángulo agudo formado entre las variables NTLM y %SSVLM, relacionadas con el primer y segundo eje canónico, indican una relación directa entre ambas. Dichas variables se encuentran a su vez inversamente relacionadas con la T^ar en el primer eje canónico. Los protistas y metazoos que se encuentran influenciados por valores elevados de la T^ar, en orden decreciente según sus valor óptimo, son los siguientes: *P. operculata*>*A. punctatus*>*E. plicatilis*≈*Periacineta* sp.≈*E. chrysemidis*≈*P. fluviatilis*≈*T. infusionum*>*A. tuberosa*≈*L. lamella*. Por el contrario, los organismos que se encuentran influenciados por valores bajos de la T^ar corresponden a: *O. coarctata*>*E. affinis*>*V. infusionum*≈*V. microstoma*≈*V. convallaria*≈nematodos≈*T. minuta*. Por último, valores elevados de las variables NTLM y %SSVLM se relacionan con: *E. affinis*>*O. coarctata*>*E. plicatilis*>*V. infusionum*≈*C. polypinum*.

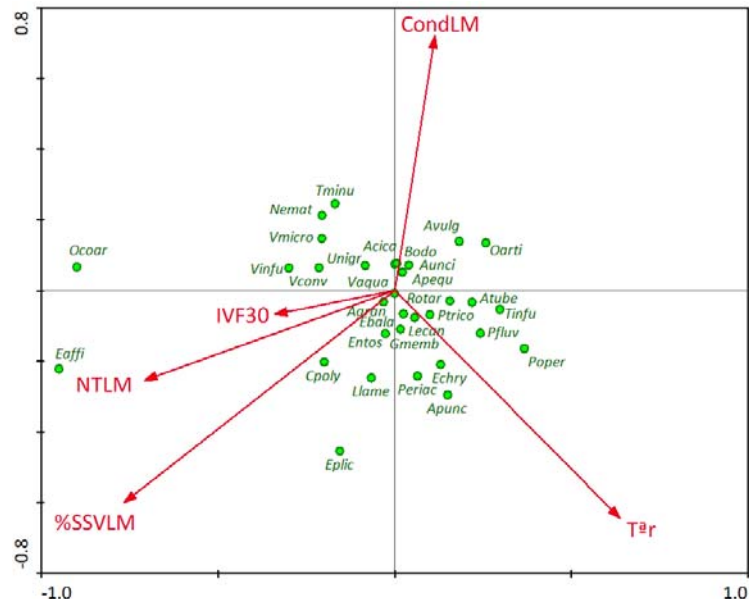


Figura 4.58. Biplot del CCA representando la relación entre variables FQLM y protistas y metazoos en la matriz total.

c) Modelos de interpretación ambiental a partir de las variables fisicoquímicas del afluente (FQAF)

Los valores del VIF de las variables FQAF en el biorreactor CX se encuentran por debajo de 10 SD, a excepción de la CPT, DBO₅/NT, DBO₅/PT, CNT y CP-PO₄³⁻ (>20 SD), eliminando por ello del modelo estas cuatro últimas debido a que no han sido seleccionadas en la rutina DISTLM en los biorreactores CXAB y CXCD. Las variables DQO/DBO₅, %DQOs, CN-NH₄⁺, CCarb, y CAGV han sido excluidas del modelo por presentar un nivel de significación mayor de 0,05.

A partir del CCA entre variables FQAF y variables biológicas en CX han sido extraídos nuevos ejes canónicos, cuyos dos primeros ejes explican el 30,9% de la variabilidad de la abundancia de protistas y metazoos, siendo el 91,4% de esta explicada por las variables FQAF (tabla 4.51). Los dos primeros ejes canónicos muestran una correlación elevada entre variables biológicas y variables FQAF. Los valores de correlación más elevados de las variables con los ejes canónicos corresponden a la CPT y CProt con el primer eje y tercer eje canónico, respectivamente, mientras que la CAG se relaciona con el segundo y tercer eje. El resultado del pCCA muestra la *ranking* en orden decreciente de la variabilidad biológica explicada por cada una de las siguientes variables: CPT (10,6%)>CAG (6,7%)>CProt (2,8%). La variabilidad explicada restante, no definida por ninguna variable en particular y que quedaría explicada por el conjunto de todas ellas, sería del 0,4%.

Tabla 4.51. Resultados del CCA entre las variables FQAF y protistas y metazoos en CX.

Ejes	1	2	3	4	Inercia total	
Valores propios	0,153	0,035	0,018	0,065	0,606	
Correlaciones v. biológicas-v. ambientales	0,876	0,800	0,675	-		
Porcentaje de la varianza explicada						
por las v. biológicas	25,2	30,9	33,8	44,6		
por la relación v. biológicas-v. ambientales	74,4	91,4	100	-		
Suma de todos los valores propios canónicos					0,205	
Variables ambientales seleccionadas	Correlaciones de Pearson (r)				Test de Montecarlo	
					F	
					p-valor	
CPT	0,8068	0,4031	-0,4319	-	9,572	0,0010
CAG	-0,2185	0,6295	-0,7457	-	6,931	0,0010
CProt	0,3323	-0,0463	-0,9420	-	2,901	0,0020

El CCA que relaciona las variables FQAF y protistas y metazoos en CX ha permitido aproximar los valores óptimos de la CPT, CAG y CProt de cada uno de los diferentes organismos (figura 4.59). Los protistas y metazoos que se encuentran más influenciados por valores elevados de la CPT, en orden decreciente según su valor óptimo, son los siguientes: *O. coarctata*>*V. infusioinum*>*E. affinis*≈*T. minuta*. Valores bajos de la variable CPT se relacionan con: *A. punctatus*>*P. operculata*≈*M. elegans*≈*Periacineta* sp.≈*E. sulcatum*>*E. plicatilis*≈*A. tuberosa*≈*O. articulata*>*Rotaria* sp.≈*P. trichophorum*≈*G. membranaceus*.

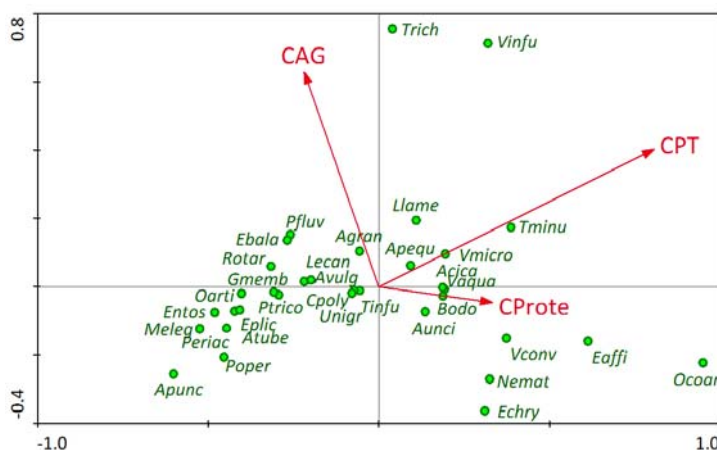


Figura 4.59. Biplot del CCA representando la relación entre variables FQAF y protistas y metazoos en CX.

Los valores del VIF de las variables FQAF en el biorreactor CT1 se encuentran por debajo de 10 SD, a excepción de la CNT, CPT, CN-NH₄⁺ y CP-PO₄³⁻ (>20 SD), excluyendo del modelo estas dos últimas. Las variables DQO/DBO₅, CNT, CPT, CCarb, CProt y CAGV han sido excluidas del modelo por presentar un nivel de significación mayor de 0,05.

A partir del CCA entre variables FQAF y variables biológicas han sido extraídos nuevos ejes canónicos, cuyos dos primeros ejes explican el 24,4% de la variabilidad de la abundancia de protistas y metazoos, siendo el 75,3% de esta explicada por las variables FQAF (tabla 4.52). Los dos primeros ejes canónicos presentan elevados coeficientes de correlación entre variables biológicas y variables FQAF, mientras que el tercero y cuarto lo hacen de forma moderada. Los valores de correlación más elevados de las variables seleccionadas con los ejes canónicos corresponden a la DBO₅/PT con el primer y tercer eje, respectivamente, el %DQOs con el segundo eje y la DBO₅/NT y CAG con el cuarto eje. El resultado del pCCA muestra el *ranking* en orden decreciente de la variabilidad biológica explicada por cada una de las siguientes variables: DBO₅/PT (7,0%)>DBO₅/NT (5,3%)>%DQOs (4,8%)>CAG (4,6%). La variabilidad explicada restante, no definida por ninguna variable en particular y que quedaría explicada por el conjunto de todas ellas, sería del 0,7%.

Tabla 4.52. Resultados del CCA entre las variables FQAF y protistas y metazoos en CT1.						
Ejes	1	2	3	4	Inercia total	
Valores propios	0,119	0,050	0,032	0,024	0,690	
Correlaciones v. biológicas-v. ambientales	0,880	0,860	0,747	0,711		
Porcentaje de la varianza explicada						
por las v. biológicas	17,2	24,4	29,0	32,4		
por la relación v. biológicas-v. ambientales	53,1	75,3	89,4	100		
Suma de todos los valores propios canónicos					0,224	
Variables ambientales seleccionadas	Correlaciones de Pearson (r)				Test de Montecarlo	
					F	p-valor
DBO ₅ /PT	0,6670	0,2205	-0,6892	0,1773	2,408	0,0020
DBO ₅ /NT	0,5319	-0,2702	0,3385	-0,7276	2,059	0,0140
%DQOs	0,5351	0,7395	0,4068	0,0351	1,795	0,0380
CAG	-0,3569	0,4492	-0,5363	-0,6191	1,790	0,0210

El CCA que relaciona las variables FQAF y protistas y metazoos en CT1 ha permitido aproximar los valores óptimos de la DBO₅/PT, DBO₅/NT y %DQOs de cada uno de los diferentes organismos (figura 4.60). Los protistas y metazoos que se encuentran más influenciados por valores elevados del %DQOs, en orden decreciente según su valor óptimo, son los siguientes: *G. membranaceus*>*T. infusionum*>*U. nigricans*. Valores elevados de la variable DBO₅/PT se relaciona con: *T. infusionum*>*G. membranaceus*>*U. nigricans*, mientras que valores elevados de la DBO₅/NT lo hacen con *T. infusionum* y *Pseudovorticella* sp.

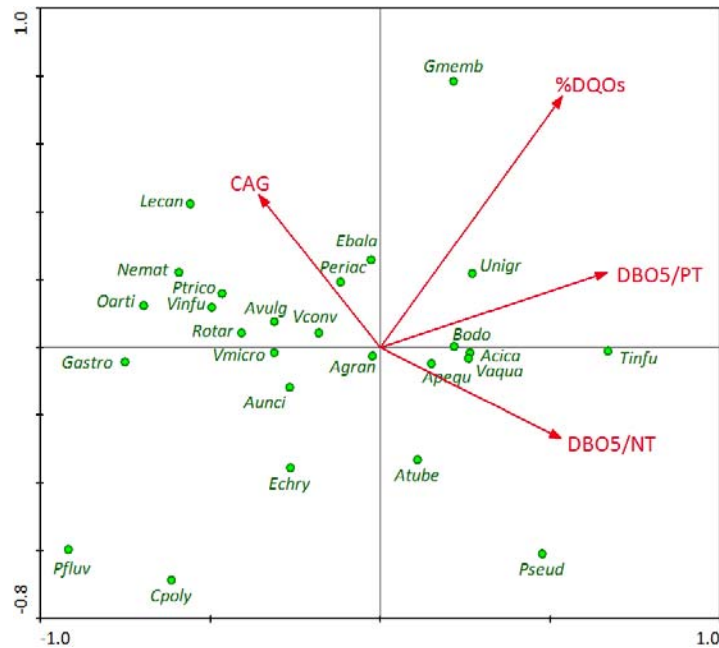


Figura 4.60. Biplot del CCA representando la relación entre variables FQAF y protistas y metazoos en CT1.

Los valores del VIF de las variables FQAF en la matriz total se encuentran por debajo de 10 SD, a excepción de la CPT y CP-PO₄³⁻ (>20 SD), eliminando del modelo esta última. Las variables DQO/DBO₅ y CNT han sido excluidas del modelo por presentar un nivel de significación mayor de 0,05.

A partir del CCA entre variables FQAF y variables biológicas han sido extraídos nuevos ejes canónicos, cuyos dos primeros ejes explican el 14,5% de la variabilidad de la abundancia de protistas y metazoos, siendo el 60,6% de esta explicada por las variables FQAF (tabla 4.53). Los dos primeros ejes muestran una correlación moderada entre variables biológicas y variables FQAF, mientras que el tercero y cuarto lo hacen de forma moderada-baja. Los valores de correlación más elevados de las variables seleccionadas con los ejes canónicos corresponden a la CPT y CCarb con el primer eje. De forma moderada lo hace la CProt y CN-NH₄⁺ con el primer eje, DBO₅/PT con el segundo eje, CN-NH₄⁺ y Cprot con el tercer eje y CAG con el cuarto eje. El resultado del pCCA muestra el *ranking* en orden decreciente de la variabilidad biológica explicada por cada una de las siguientes variables: CAG (1,8%)>%DQOs (1,7%)>CProt (1,5%)>DBO₅/PT (1,3%)=CPT (1,3%)>DBO₅/NT (1,1%)>CAGV (1,0%)>CN-NH₄⁺ (0,8%)>CCarb (0,8%). La variabilidad explicada restante, no definida por ninguna variable en particular y que quedaría explicada por el conjunto de todas ellas, sería del 0,7%.

Tabla 4.53. Resultados del CCA entre las variables FQAF y protistas y metazoos en la matriz total.

Ejes	1	2	3	4	Inercia total	
Valores propios	0,068	0,037	0,026	0,013	0,743	
Correlaciones v. biológicas-v. ambientales	0,730	0,757	0,682	0,538		
Porcentaje de la varianza explicada						
por las v. biológicas	9,1	14,1	17,6	19,3		
por la relación v. biológicas-v. ambientales	39,4	61	75,8	83,3		
Suma de todos los valores propios canónicos					0,172	
Variables ambientales seleccionadas	Correlaciones de Pearson (r)				Test de Montecarlo	
					F	
					p-valor	
CPT	0,8475	-0,1796	-0,1426	-0,2652	10,508	0,0010
CAG	0,3397	-0,2929	-0,5028	-0,5518	4,915	0,0010
DBO ₅ /PT	-0,4390	0,5730	-0,2645	-0,0387	4,799	0,0010
%DQOs	-0,4039	-0,4346	-0,5063	0,3968	4,082	0,0010
CProt	0,6053	0,0317	-0,6279	-0,1047	3,422	0,0010
CAGV	0,3274	-0,3236	-0,1095	0,1198	2,690	0,0010
DBO ₅ /NT	-0,0477	0,0389	-0,3180	0,1359	2,328	0,0040
CN-NH ₄ ⁺	0,6299	-0,1443	-0,6060	-0,2097	2,039	0,0110
CCarb	0,7877	0,1692	-0,4040	-0,0387	1,597	0,0490

El CCA que relaciona las variables FQAF y protistas y metazoos a partir de la matriz total ha permitido aproximar los valores óptimos de la CPT, CCarb, CProt y CN-NH₄⁺ de cada uno de los diferentes organismos, principalmente en el primer eje canónico (figura 4.61). Los vectores que representan dichas variables forman ángulos agudos, indicando una relación directa entre ellas. Los protistas y metazoos que se encuentran en general más influenciados por valores elevados de dichas variables son los siguientes: *O. coarcatata*>*E. affinis*>*V. infusioformis*>*T. infusioformis*.

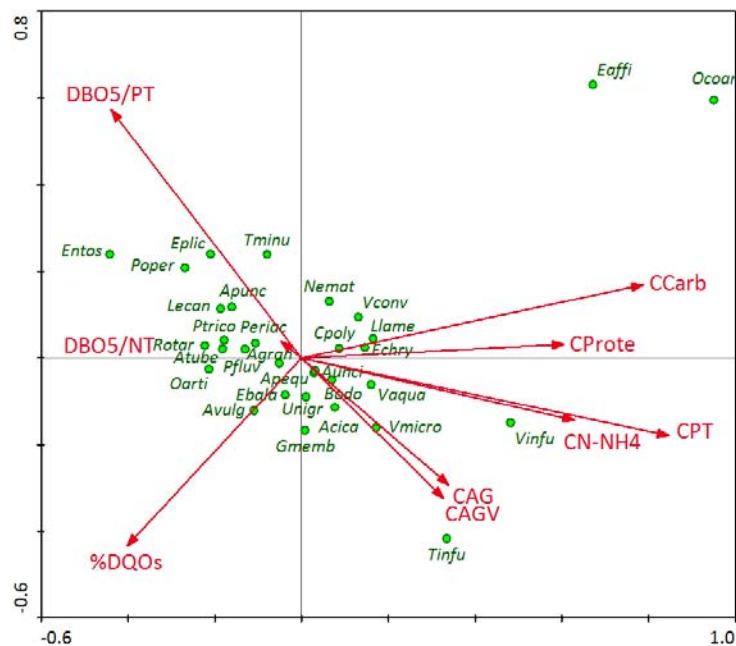


Figura 4.61. Biplot del CCA representando la relación entre variables FQAF y protistas y metazoos en la matriz total.

4.4 Dinámica poblacional de la comunidad de bacterias filamentosas en respuesta al factor biorreactor y estacional.

Durante todo el periodo de muestreo se han identificado en los seis biorreactores un total de 17 morfotipos filamentosos, cuya composición relativa ha revelado algunas claras diferencias (figura 4.62). Las bacterias formadoras de espumas del tipo GALO (nocardioformes) (figura 4.63a) han presentado la mayor frecuencia relativa en los biorreactores CT1 y CT2, mientras que *M. parvicella* lo ha hecho en la EDAR CX y DN. Por otro lado, los morfotipos 0803/0914 y 0092 han mostrado las mayores frecuencias en los biorreactores DN, CT1 y CT2, encontrándose el morfotipo 1851, además de forma exclusiva, en estos dos últimos (figura 4.63e). En el caso del morfotipo filamentosos 1701 (figura 4.63b), la mayor frecuencia se observa en QB, CXAB y CXCD, siendo en estos dos últimos además muy frecuentes los morfotipos 0411 (figura 4.63c), 0581 (figura 4.63d) y 021N*. Este último, el cual se ha encontrado también de forma frecuente en el resto de biorreactores, ha mostrado una gran similitud morfológica con el morfotipo 021N de Eikelboom pero con menor diámetro y longitud (figura 8.7 del anexo). *Thiothrix* (I, II) se ha encontrado mayoritariamente en QB y DN, coincidiendo con las menores frecuencias de *N. limicola* I. Por último, los morfotipos 0041 (figura 4.63f) y *N. limicola* III se han mostrado representados en todos los biorreactores. Cabe destacar por su interés la identificación en QB de un microorganismo filamentosos similar a *M. parvicella*, el cual ha sido denominado en nuestro trabajo como *M. parvicella**, de menor diámetro celular y mostrando una respuesta positiva a la tinción de Neisser (figura 8.8 del anexo). Además, en la EDAR CX han sido también observados dos morfotipos filamentosos, que hemos denominado como CX-02 y CX-03. En el caso de CX-02, muestra una gran similitud con el descrito como tipo 1852 (Eikelboom, 2000; Jenkins *et al.*, 2004), mientras que en el caso de CX-03 no ha podido ser afiliado a ninguno de los morfotipos convencionales (figuras 8.9 y 8.10 del anexo).

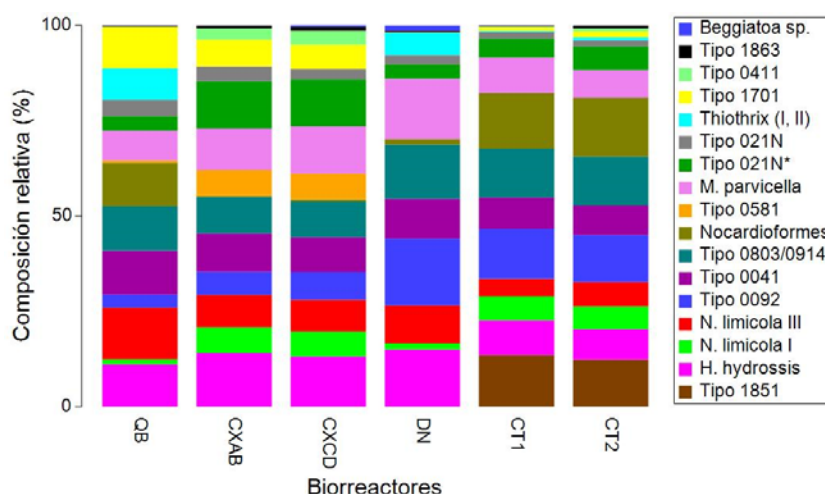


Figura 4.62. Composición relativa de los morfotipos filamentosos durante el periodo de estudio.

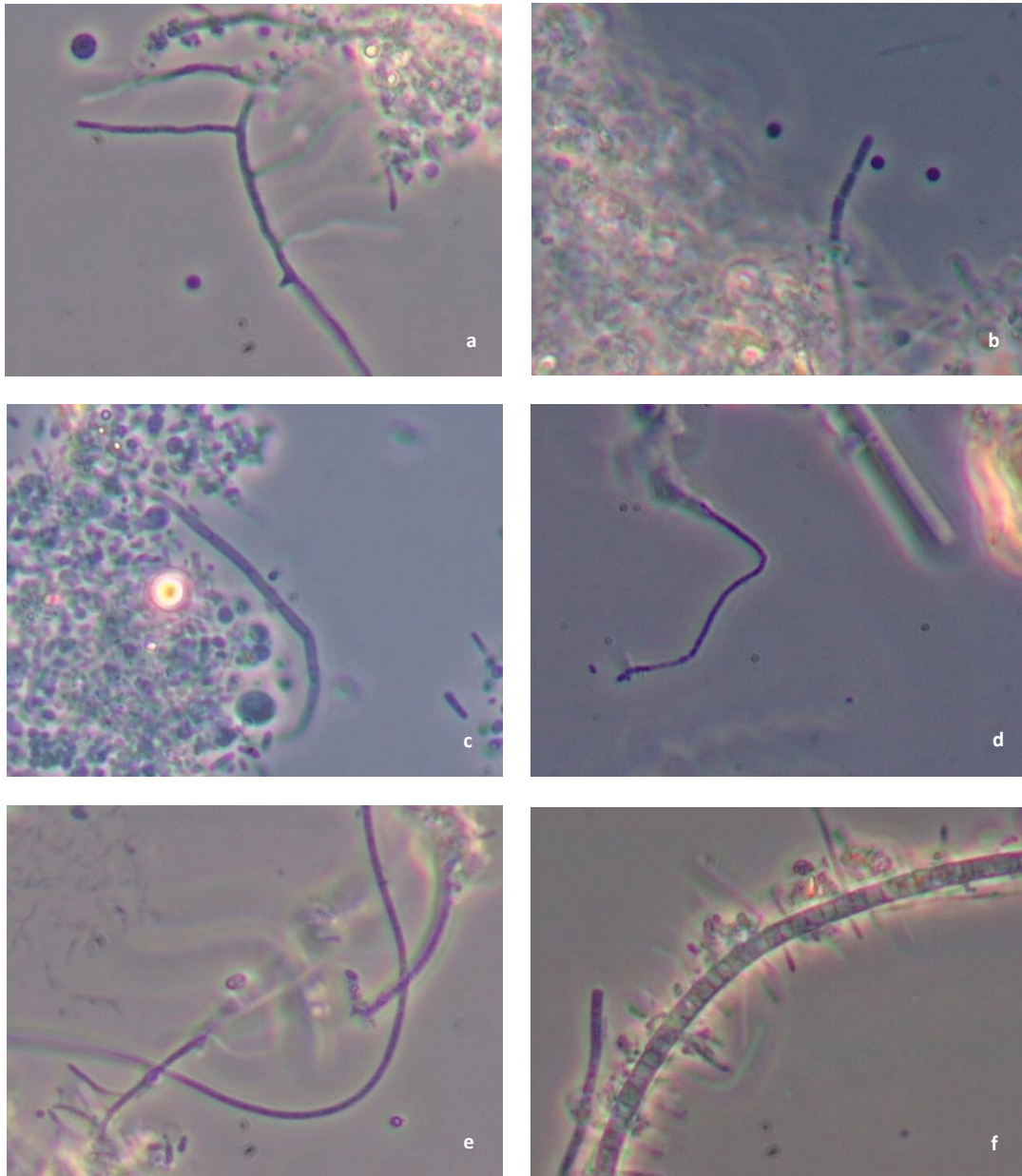


Figura 4.63. Morfotipos filamentosos. (a) Nocardioformes (GALO). Contraste de fases, 1000x. (b) Tipo 1701. Contraste de fases, 1000x. (c) Tipo 0411. Contraste de fases, 1000x. (d) Tipo 0581. Contraste de fases, 1000x. (e) Tipo 1851. Contraste de fases, 1000x. (f) Tipo 0041. Contraste de fases, 1000x.

Para visualizar y valorar la abundancia absoluta (IF) de los microorganismos filamentosos a lo largo del periodo de muestreo, se han representado los gráficos de trazado sombreado (*shade plots*) correspondientes a cada uno de los biorreactores (figuras 8.1-8.6 del anexo).

La composición relativa de las bacterias filamentosas que han hibridado positivamente con las sondas 16S rDNA utilizadas se muestra en la figura 4.64. *Haliscomenobacter hydroxsis* (sonda HHY) ha sido muy frecuente en todos los biorreactores, siendo especialmente elevada su frecuencia en CXAB y CXCD (figura 8.11 del anexo). Por otro lado, las bacterias filamentosas 0803 se han encontrado en general con una frecuencia elevada en todos los biorreactores, hibridando positivamente con las siguientes sondas: Caldi-0678 (género *Caldilinea*), T0803-0654 (T0803-D) (figuras 8.12a y b del anexo) y T0803ind-0642 (T0803-I) (figuras 8.12c y d del anexo), siendo la frecuencia de esta última inferior a la T0803-D en las EDAR QB y CX. Las bacterias identificadas con las sondas diseñadas para el morfotipo 0914 se han encontrado con una frecuencia inferior a las correspondientes al morfotipo 0803, hibridando negativamente con la sonda CFX67b (T0914-b) y positivamente con CFX67a (T0914-a) (figura 8.13 del anexo). La mayor frecuencia en el caso de esta última se ha observado principalmente en CT1, CT2 y DN, siendo baja en QB y nula en CXAB y CXCD. En general, las bacterias filamentosas pertenecientes al género *Thiothrix* (sonda G123I) se han mostrado poco frecuentes, siendo las mayores frecuencias las correspondientes a *T. fructosivorans* (sonda TFR) (figuras 8.15e y f del anexo) en DN y *T. eikelboomii* (sonda G2M) (figuras 8.15a y b del anexo) y *T. nivea* (sonda TNI) (figuras 8.15c y d del anexo) en QB. Las sondas G1B y G3M, correspondientes a *T. disciformis* y *T. defluvi*, respectivamente, hibridaron negativamente en todos los biorreactores. Por otro lado, las señales positivas de las sondas correspondientes a las dos variantes del morfotipo 0092 (T0092-A y T0092-B) han revelado claras diferencias. La variante T0092-A (sonda CFX197) (figuras 8.14a y b del anexo) se ha mostrado en general mucho más frecuente que la variante T0092-B (sonda CFX223) (figuras 8.14c y d del anexo), siendo la primera más frecuente en los biorreactores DN, CT1 y CT2. En cambio, las muestras correspondientes a la EDAR CT y QB no hibridaron positivamente con T0092-B.

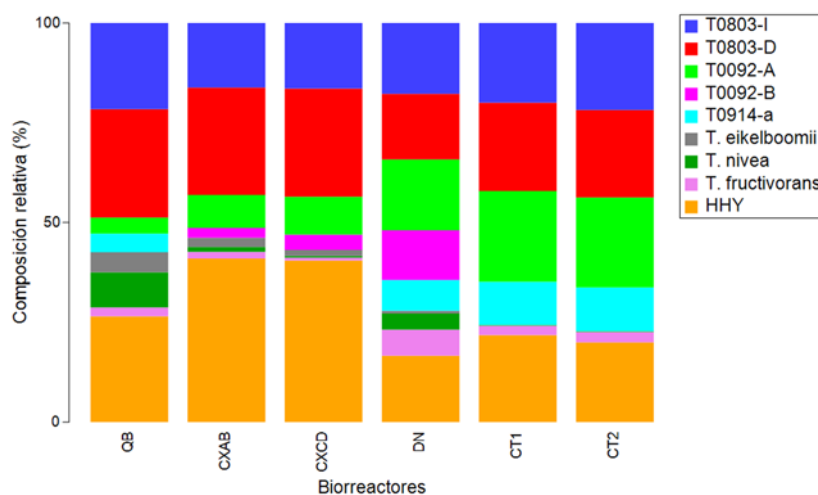


Figura 4.64. Composición relativa de las sondas 16S rDNA hibridadas en cada uno de los biorreactores.

Las bacterias *Nostocoida limicola* identificadas mediante la técnica FISH muestran una composición relativa heterogénea entre los biorreactores QB, CXAB, CXCD y DN (figura 4.65). *Trichococcus* sp. (sonda NLIMI91) (figura 8.16f del anexo) y *T. japonica* (sonda NLIMIII192) (figura 8.16a del anexo) se muestran frecuentes en todos los biorreactores, mientras que *Ca. 'A. europaea'* (sonda Noli-644) (figura 8.16c del anexo) lo hace principalmente en QB y DN. El resto de bacterias no se han encontrado en algunos de los biorreactores. En este sentido, *N. limicola* II *Chloroflexi* (sonda AHW183) (figura 8.16b del anexo) se encuentra ausente y poco frecuente en DN y QB, respectivamente, mientras que *Ca. 'M. batavus'* (sonda MC2-649) (figura 8.16d del anexo) se muestra ausente en este último biorreactor. Por último, *Isosphaera* sp. (sonda NLIMIIIImix) (figura 8.16e del anexo) se ha identificado con mayor frecuencia relativa en QB, siendo menor en el caso de DN y prácticamente ausente en la EDAR CX.

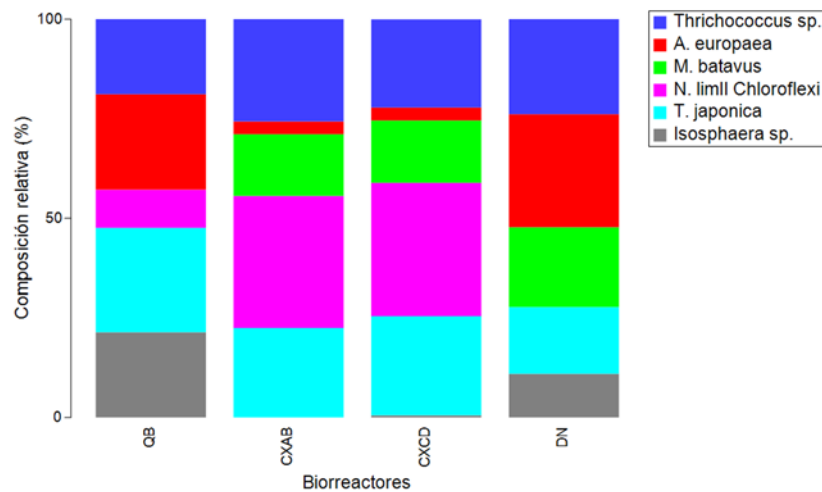


Figura 4.65. Composición relativa de las bacterias *Nostocoida limicola* identificadas en las EDAR QB, CX y DN.

Las bacterias *Microthrix parvicella* identificadas mediante la técnica FISH muestran una composición relativa similar entre los biorreactores CXAB y CXCD (figura 4.66). La sonda general Mpa-all-1410, diseñada para la identificación de todas las bacterias del género *Microthrix*, ha hibridado positivamente en ambos biorreactores (figura 8.17 del anexo). Por otro lado, la sonda específica de *Ca. 'M. parvicella'* (MPA-645) ha mostrado mayor porcentaje relativo que la correspondiente a la sonda MPA-60, mientras que *Ca. 'M. calida'* ha sido identificada con el menor porcentaje relativo.

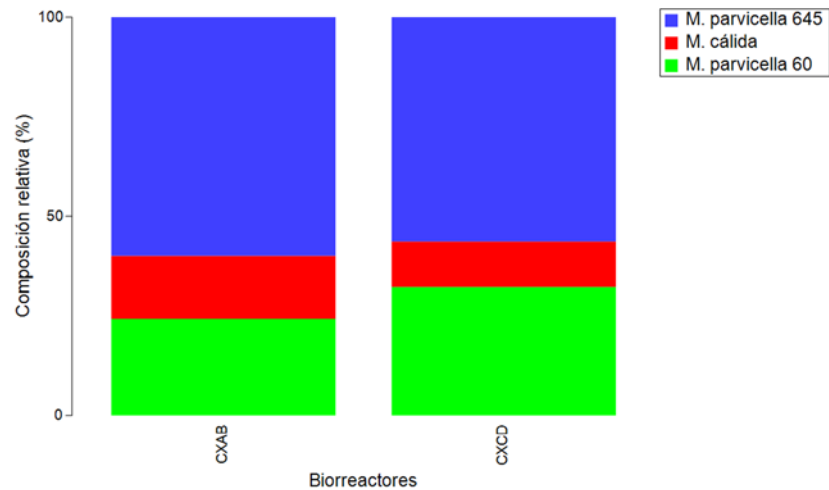


Figura 4.66. Composición relativa de bacterias del género *Microthrix* identificadas en la EDAR CX.

La figura 4.67 representa la distribución de muestras de los biorreactores en el nMDS, a partir de la densidad absoluta (IF) de bacterias filamentosas y en función del factor biorreactor. El nivel de *strees* moderado observado reduce la dimensionalidad de la ordenación, por ello y con el fin de representar mejor las agrupaciones, se ha superpuesto el análisis clúster con un nivel de similitud de 70 según la distancia de Bray-Curtis. La figura del nMDS muestra un patrón de distribución con una clara separación de los biorreactores a partir de los microorganismos filamentosos representados en las figuras 4.61 y 4.63. Además, la agrupación clúster ha revelado principalmente la presencia de cuatro grandes grupos, acorde con los resultados obtenidos de ordenación del nMDS: un grupo compuesto por muestras procedentes de QB, otro con muestras de CT y DN, y dos grupos mixtos con muestras de CXAB y CXCD.

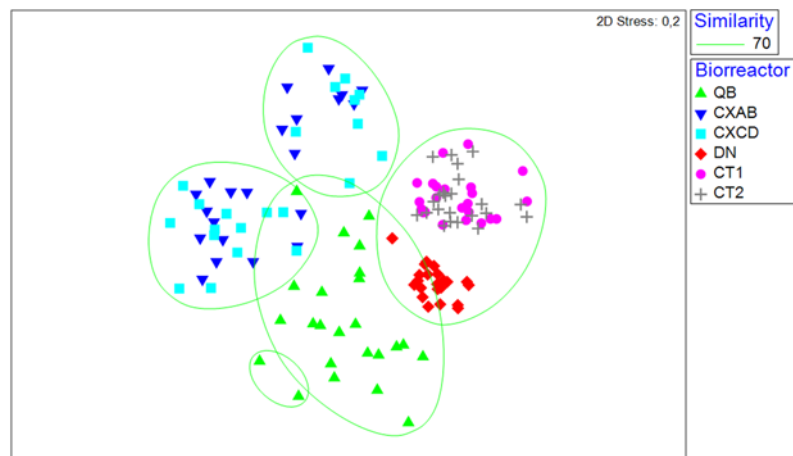


Figura 4.67. Análisis clúster y nMDS a partir de la densidad de bacterias filamentosas, según el factor biorreactor.

Los dos grupos mixtos de muestras procedentes de CXAB y CXCD han sido representados en el nMDS con el fin de explorar sus diferencias (figura 4.68). Para ello, se ha utilizado el gráfico de burbujas, representando la EF y superponiendo los vectores de correlación de Pearson (mayores de 0,50 y -0,50) de las bacterias filamentosas. En este sentido, las distancias entre los grupos de muestras podrían deberse a la influencia de la baja EF en las siguientes bacterias: *Ca. 'M. parvicella'* (MPA645), *Micotbrix* (MPA1410), *N. limicola* II-*Chloroflexi*, tipo 0411, *M. parvicella*, *Ca. 'M. batavus'*, *N. limicola* III, CX-02 y CX-03. Contrariamente, la distancia en el nMDS debido a la influencia de la elevada EF podría estar justificada por la presencia abundante de las siguientes bacterias: *H. hydrossis*, tipo 0041, tipo 0581, tipo 0092, tipo 0092-A, *Ca. 'A. europaea'* y tipo 0092-B.

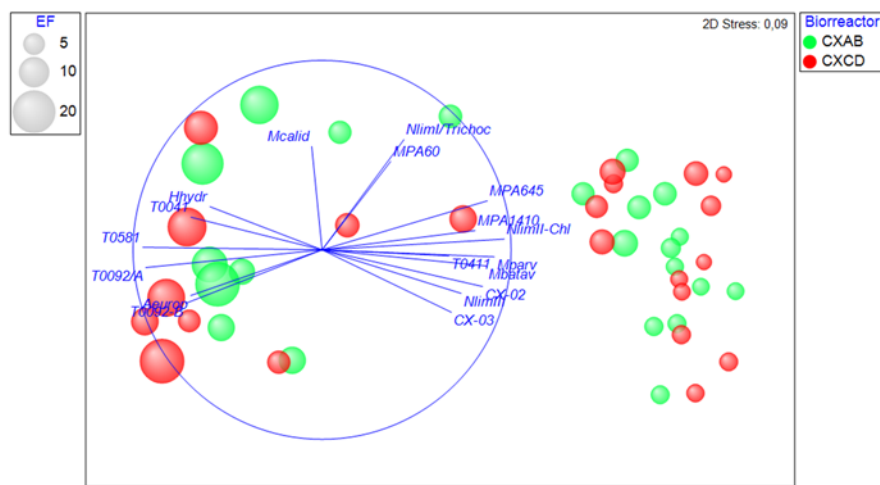


Figura 4.68. nMDS y gráfico de burbujas de la EF a partir de la densidad de bacterias filamentosas en CX, según el factor biorreactor. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,45 y -0,45.

El ANOSIM cruzado ha sido utilizado para representar las diferencias a partir de las abundancias absolutas de bacterias filamentosas y según los dos factores estudiados; biorreactor y estacional (tabla 4.54). Los resultados obtenidos a partir del ANOSIM están de acuerdo con el patrón encontrado en el nMDS (figura 4.67), revelando la existencia de diferencias significativas entre los biorreactores y a lo largo de las estaciones. El valor 0,71 del estadístico global R indica que existe una buena separación entre biorreactores. Los estadísticos R parciales encontrados también estarían de acuerdo con las observaciones del nMDS, siendo los biorreactores que presentan mayor separación: DN-CT, CXAB-CT y CXAB-DN. Por otro lado, los biorreactores CXAB-CXCD y CT1-CT2 no muestran una separación significativa, indicando que sus respectivas comunidades de bacterias filamentosas fueron muy similares a lo largo del tiempo.

Las rutinas ANOSIM y PERMANOVA de 1 vía han permitido explorar las distancias debidas solo al factor estacional, así como el contraste de hipótesis de las diferencias significativas, respectivamente. Los resultados del ANOSIM han revelado una baja separación entre estaciones a partir de la densidad de microorganismos filamentosos, con un estadístico R global de 0,09 y un nivel de significación del 0,1%. Las mayores distancias han sido observadas entre otoño-invierno (R=0,14) y otoño-primavera (R=0,12), siendo poco significativas en el resto de las estaciones. Por otro lado, los resultados de la rutina PERMANOVA (df=3; SS=6578,3; MS=2192,8; Pseudo-F=4,59 y p[perm]=0,001) indican que existen diferencias significativas a partir de la densidad de bacterias filamentosas y según el factor estacional, siendo dichas diferencias las correspondientes a otoño-invierno y otoño-primavera.

Tabla 4.54. ANOSIM cruzado de 2 vías a partir de las abundancias absolutas de bacterias filamentosas, según el factor "biorreactor-estacional".

	R	Significancia (%)
BIORREACTOR	0,717	0,1
QB, CXAB	0,759	0,1
QB, CXCD	0,728	0,1
QB, DN	0,806	0,1
QB, CT1	0,877	0,1
QB, CT2	0,864	0,1
CXAB, CXCD	-0,156	99,9
CXAB, DN	0,914	0,1
CXAB, CT1	0,908	0,1
CXAB, CT2	0,921	0,1
CXCD, DN	0,854	0,1
CXCD, CT1	0,867	0,1
CXCD, CT2	0,871	0,1
DN, CT1	0,907	0,1
DN, CT2	0,939	0,1
CT1, CT2	-0,035	68,1

El CAP a partir de la densidad de bacterias filamentosas y según el factor estacional ha sido realizado debido a las diferencias significativas encontradas entre estaciones en la rutina PERMANOVA (figura 4.69). Los resultados han permitido encontrar los ejes, a través de la nube de puntos multivariante, que mejor discriminan grupos de objetos, en este caso en función del factor estacional y a partir de la comunidad bacteriana, siendo significativas las diferencias encontradas ($\text{tr}=0,4873$; $P=0,001$; 999 permutaciones). Los ejes del PCoA ortonormales seleccionados ($m=6$) describen el 96,5% de la variación total de la nube de puntos descritos por la matriz distancia de Bray-Curtis, con el 47,8% de asignaciones correctas. El primer eje canónico resultante del CAP ($\delta^2=0,38$) ha permitido separar, aunque de forma superpuesta, grupos de muestras respecto al factor estacional. Con el fin de revelar aquellos gradientes de abundancia de bacterias filamentosas relacionados con las estaciones que más contribuyen a la discriminación de los grupos, se han superpuesto los vectores de correlación de Pearson ($r>0,4$) de las variables biológicas con los ejes

canónicos extraídos. Los resultados indican que *M. parvicella*, *N. limicola* III y el morfotipo 0411 se asocian principalmente con invierno y primavera. Contrariamente, el tipo 0092 (variante A) y los morfotipos 0041, 0092 y 0581 lo han hecho principalmente con otoño. Los resultados de la validación cruzada muestran que el valor más bajo del porcentaje de asignación corresponde a verano (38%), siendo muy similares en el resto de estaciones (50%) (tabla 4.55). El error de mala clasificación de la validación cruzada es del 52,21%.

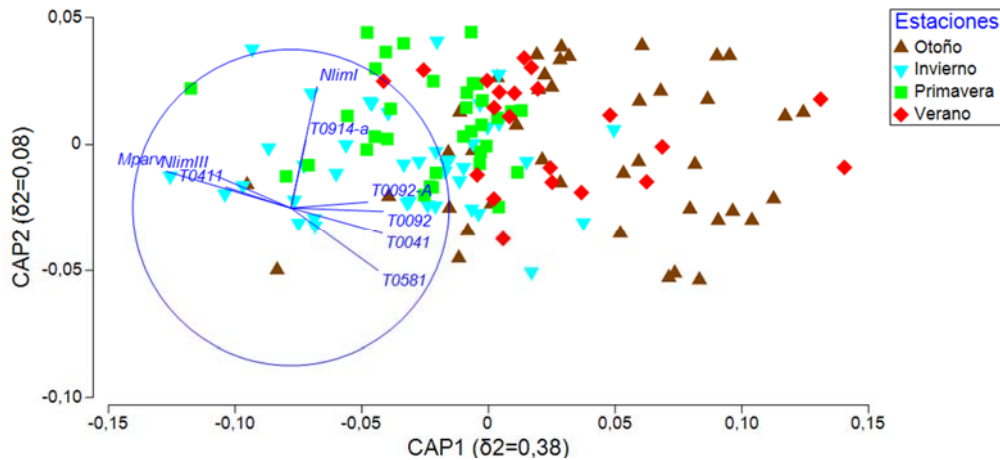


Figura 4.69. CAP a partir de la densidad de bacterias filamentosas, según el factor estacional. Los vectores representan la correlación de las variables biológicas ($r > 0,4$) con los ejes canónicos. $\delta^2 =$ el cuadrado de la correlación canónica.

Tabla 4.55. Resultados de la validación cruzada de la rutina CAP a partir de la densidad absoluta de bacterias filamentosas, según el factor estacional.

Grupo original	Otoño	Invierno	Primavera	Verano	Total	% asignación
Otoño	20	6	5	10	41	49
Invierno	3	20	14	3	40	50
Primavera	1	11	17	5	34	50
Verano	7	1	5	8	21	38

A pesar de la evidente separación entre biorreactores, demostrada en el nMDS y rutina ANOSIM, se ha utilizado el CAP con el fin de determinar aquellas bacterias filamentosas que más han contribuido a la discriminación entre grupos, y por lo tanto, que podrían estar más relacionadas con los distintos biorreactores (figura 4.70). Los resultados muestran diferencias significativas según el factor biorreactor ($tr=2,4036$; $P=0,001$; 999 permutaciones). Los ejes del PCoA ortonormales seleccionados ($m=5$) describen el 90,97% de la variación total de la nube de puntos descrita por la matriz distancia de Bray-Curtis, con el 63,97% de asignaciones correctas. Los dos primeros ejes canónicos resultantes del CAP ($\delta^2=0,91$ y $0,71$) han permitido separar grupos de muestras respecto al factor biorreactor, con

una elevada correlación canónica. Por otro lado, han sido superpuestos los vectores de correlación de Pearson de las bacterias filamentosas con los ejes canónicos ($r > 0,5$), correlacionándose un número moderado de variables biológicas con dichos ejes, lo que contribuye a la discriminación entre grupos. El gradiente del tipo 021N* ha contribuido principalmente a la discriminación de CX, mientras que los correspondientes a *T. nivea*, *Thiothrix* (G123T) y *Thiothrix* (I, II) lo hacen para QB y DN. Por otro lado, T0803-D, T0803-I, T0803-cal, T0803, T0092, T0092-A, nocardioformes (GALO) y T1851 han contribuido principalmente a la discriminación de CT. Los resultados de la validación cruzada muestran un excelente porcentaje de asignación de las distintas variables biológicas en el caso de QB y DN, moderado en el caso de CXAB y CXCD, y malo en el caso de la EDAR CT (tabla 4.56). El error de mala clasificación de la validación cruzada es moderado (36%).

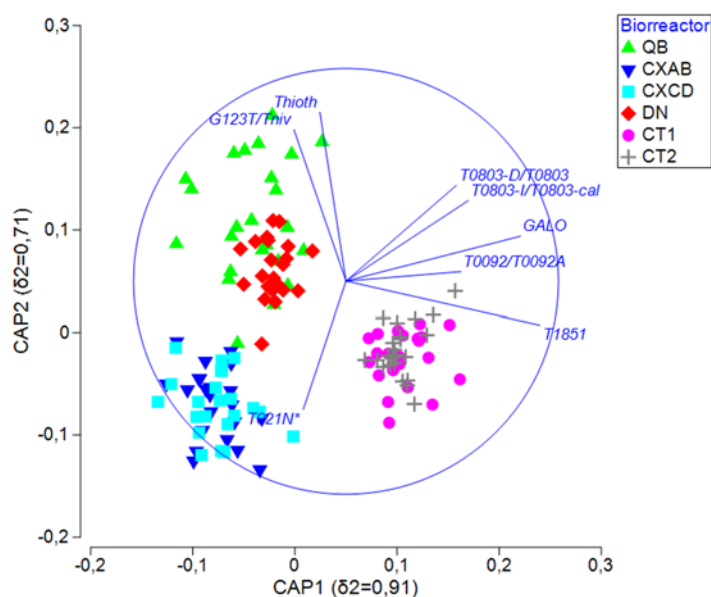


Figura 4.70. CAP a partir de la densidad de bacterias filamentosas, según el factor biorreactor. Los vectores representan la correlación de las variables biológicas ($r > 0,5$) con los ejes canónicos. δ^2 = el cuadrado de la correlación canónica.

Tabla 4.56. Resultados de la validación cruzada de la rutina CAP a partir de la densidad absoluta de bacterias filamentosas, según el factor biorreactor.

Grupo original	QB	CXAB	CXCD	DN	CT1	CT2	Total	% asignación
QB	23	1	0	0	0	0	24	96
CXAB	0	12	10	0	0	0	22	55
CXCD	0	9	13	0	0	0	22	59
DN	0	0	0	22	0	0	22	100
CT1	0	0	0	0	8	15	23	35
CT2	0	0	0	0	14	9	23	39

4.5 Influencia de las variables operacionales y fisicoquímicas en la dinámica poblacional de la comunidad de bacterias filamentosas

4.5.1 Exploración de la inercia biológica de las variables operacionales

De la misma forma que para protistas y metazoos, se ha explorado la inercia biológica de la EF, CM, TRHr y TRHds a partir de la abundancia de los microorganismos filamentosos (tabla 4.57). La matriz distancia euclídea de cada una de las nuevas variables de la EF, CM (DBO₅), CM* (DQOs), TRHr y TRHds ha sido relacionada con la matriz distancia biológica, calculada a partir de la distancia de Bray-Curtis de cada uno de los biorreactores, utilizando la rutina BIO-ENV. Las variables con los coeficientes de correlación más elevados (marcados en negrita) se han considerado como las más adecuadas para su inclusión en los tratamientos estadísticos de interpretación ambiental. En general, se observa que los coeficientes de correlación de Spearman resultantes son claramente superiores a los encontrados en el caso de la comunidad de protistas y metazoos. La EF que más se relaciona con la dinámica poblacional de microorganismos filamentosos se encuentra entre 6-7 días anteriores al recuento (EF6-EF7), a excepción de CT2, la cual se corresponde con 2 días (EF2). Los coeficientes de correlación más elevados de la EF corresponden a los biorreactores CXAB y CXCD. La CM y CM* muestran los coeficientes de correlación más elevados en el caso de los biorreactores CXAB y CXCD, siendo moderado-bajo en el caso de QB y bajo en el resto de biorreactores. Además, no se observan diferencias significativas entre las distintas variables promedio de la CM y CM*, a excepción de CT1 y CT2, siendo en general los promedios más significativos aquellos que consideran los días más distantes al recuento (CM3 y CM2b). En el caso del TRHr y TRHds, los coeficientes de correlación más elevados han correspondido a QB y CT1, siendo también los promedios más significativos aquellos que consideran los días más distantes al recuento (TRHr3, TRHr2b, TRHds3 y TRHds2b).

En el caso de la exploración de la inercia biológica asociada al OD empleando la rutina BIO-ENV, también se han considerado las diferentes posiciones del medidor en línea del OD (P1, P2 y P3), considerando a su vez las variables X1 y X3 (descritas anteriormente). En la tabla 4.58 aparecen señaladas en negrita las variables que muestran los mayores coeficientes de correlación de Spearman de la rutina BIO-ENV y, por lo tanto, las más adecuadas para el análisis de interpretación ambiental. En el caso de QB, CXAB y CXCD corresponden a los valores del OD del día anterior al muestreo y en la P3, mientras que en DN corresponden al promedio de los tres días anteriores al muestreo y en la P1. Por último, la correlación más significativa del OD en CT1 y CT2 corresponde al promedio de los tres días anteriores, siendo el ODb en P1, ODm en P2 y ODa en P3.

Tabla 4.57. Coeficientes de correlación de Spearman (BIO-ENV) de las variables promedio de la EF, CM, TRHr y TRHds, relacionadas con la abundancia de bacterias filamentosas.

	QB	CXAB	CXCD	DN	CT1	CT2
EF1	<0,01	0,53	0,32	<0,01	<0,01	0,19
EF2	0,05	0,53	0,36	<0,01	<0,01	0,22
EF3	<0,01	0,55	0,45	0,07	<0,01	0,18
EF4	0,01	0,53	0,45	0,03	<0,01	0,13
EF5	0,08	0,53	0,44	0,03	<0,01	0,03
EF6	0,16	0,60	0,48	0,05	0,07	<0,01
EF7	0,21	0,63	0,52	0,08	0,06	<0,01
CM1	0,20	0,39	0,32	<0,01	0,01	0,06
CM2a	0,18	0,56	0,45	<0,01	0,04	0,08
CM2b	0,29	0,34	0,31	0,08	0,08	0,02
CM3	0,26	0,56	0,49	<0,01	0,05	0,04
CM1*	0,11	0,17	0,10	0,008	0,08	0,164
CM2a*	0,09	0,30	0,23	<0,01	0,01	0,132
CM2b*	0,16	0,13	0,12	0,15	<0,01	0,072
CM3*	0,12	0,38	0,33	0,053	<0,01	0,005
TRHr1	0,08	0,03	0,01	<0,01	0,10	0,09
TRHr2a	0,04	0,01	<0,01	<0,01	0,14	<0,01
TRHr2b	0,21	0,06	0,06	<0,01	0,21	<0,01
TRHr3	0,25	0,04	0,03	<0,01	0,19	<0,01
TRHds1	0,25	0,04	<0,01	0,01	0,04	<0,01
TRHds2a	0,28	<0,01	<0,01	<0,01	0,11	0,02
TRHds2b	0,12	0,06	0,06	<0,01	0,20	0,14
TRdsH3	0,24	0,06	0,01	<0,01	0,16	0,07

*Calculada con la DQO soluble

Tabla 4.58. Coeficientes de correlación de Spearman de la rutina BIO-ENV de las variables promedio y posición del OD, relacionadas con la abundancia de bacterias filamentosas.

Posición	Variable	QB	CXAB	CXCD	DN	CT1	CT2
P1	ODb1	-	-	-	0,23	<0,01	0,14
	ODm1	-	-	-	0,28	<0,01	0,13
	ODa1	-	-	-	0,07	<0,01	<0,01
P2	ODb1	-	-	-	0,05	0,22	0,20
	ODm1	-	-	-	0,17	<0,01	0,06
	ODa1	-	-	-	<0,01	<0,01	0,21
P3	ODb1	0,02	0,04	0,03	0,23	<0,01	0,26
	ODm1	0,02	0,05	0,08	0,28	<0,01	<0,01
	ODa1	<0,01	<0,01	0,03	0,07	<0,01	0,06
P1	ODb3	-	-	-	0,27	0,02	0,15
	ODm3	-	-	-	0,27	0,09	0,02
	ODa3	-	-	-	0,13	<0,01	0,01
P2	ODb3	-	-	-	<0,01	0,23	0,13
	ODm3	-	-	-	0,40	0,04	0,06
	ODa3	-	-	-	<0,01	0,12	0,19
P3	ODb3	<0,01	<0,01	0,06	0,18	0,13	0,11
	ODm3	<0,01	<0,01	<0,01	<0,0	0,04	0,06
	ODa3	<0,01	<0,01	<0,01	0,09	0,13	0,09

4.5.2 *Búsqueda de modelos de interpretación ambiental*

La rutina BVSTEP también ha permitido encontrar la combinación de variables ambientales que mejor explica el conjunto de datos de la matriz distancia de microorganismos filamentosos, utilizando el método de correlación de rangos de Spearman y el criterio $\rho > 0,95$ y $\Delta \rho < 0,001$. La estrategia exploratoria a seguir ha sido la misma que la aplicada en el caso de protistas y metazoos. En un primer paso el objetivo es comparar las variables ambientales seleccionadas por BVSTEP, en función de su tipología (OPE, FQLM y FQAF), entre cada uno de los biorreactores y la matriz total (tabla 4.59). En un segundo paso el objetivo es comparar la selección de las variables y sus coeficientes de correlación, en el caso de no tener en cuenta la tipología de dichas variables, así como la comparación de estas entre los biorreactores y la matriz total (tabla 4.60). El efecto de la multicolinealidad ha sido evaluado a través del gráfico de dispersión de puntos (*draftman plots*), eliminando una variable de aquellos pares cuyos coeficientes de correlación de Spearman fueron superiores a 0,95 (marcadas con el símbolo >).

Entre las variables OPE que más han contribuido a explicar la variabilidad de la comunidad de bacterias filamentosas se encuentra la EF y la CMDQOs. Además, la R.rec parece contribuir a la variabilidad biológica de algunos biorreactores, como son: DN, QB y CT2, mientras que el TRHds lo hace en estos dos últimos biorreactores y en la matriz total. Por otro lado, la CO₃ muestra una influencia significativa en los biorreactores en los cuales fue aplicado el ozono para combatir las espumas biológicas (CT1 y CT2). En general, los coeficientes de correlación del conjunto de variables OPE seleccionadas son muy similares entre los biorreactores y la matriz total, exceptuando DN, CT2 y CT, en los que han sido inferiores. Entre las variables FQLM que más han contribuido a explicar la variabilidad biológica se encuentra la T^ar, el IVF30 y el NTLM, mientras que las variables pHLM y DQOLM no parecen contribuir a dicha variabilidad. Respecto a las variables FQLM, se ha encontrado una variabilidad significativa de los coeficientes de correlación de Spearman entre los distintos biorreactores y la matriz total. El mayor coeficiente ha correspondido a QB ($r=0,71$), siendo moderado en el caso de la matriz total ($r=0,44$) y moderado-bajo en DN ($r=0,29$), CX ($r=0,35$) y CT1 ($r=0,34$). En el caso de CT2 y CT han sido bajos y no significativos. Respecto al grupo de las variables FQAF, las más seleccionadas han sido las siguientes: CNT, CPT, CCarb y CSO₄²⁻, mientras que la relación DQO/DBO₅, CN-NH₄⁺, CProt, DBO₅/NT y CS²⁻ no parecen contribuir a la variabilidad de la comunidad de bacterias filamentosas. Los coeficientes de correlación del conjunto de variables FQAF han mostrado los mayores coeficientes de Spearman en los biorreactores QB, CX (AB y CD) y matriz total, mientras que en DN y CT (CT1 y CT2) han sido bajos y no significativos.

Tabla 4.59. Variables ambientales seleccionadas en la rutina BVSTEP y coeficientes de correlación por tipología de variable y en cada uno de los biorreactores y matriz total, a partir de la comunidad de bacterias filamentosas.

		QB	CXAB	CXCD	CX	DN	CT1	CT2	CT	Matriz total
OPE	EF		X	X	X			X	X	X
	CM	X						X		
	CMDQOs	>	X	X	X			X		
	TRHr	X								
	TRHds	X				>	>	X		X
	SSLM							X		X
	R.rec	X				X		X		
	ODb					X				X
	ODm					X				X
	ODa									X
	CO ₃ (rho)	-	-	-	-	-	X	X	X	
		0,51*	0,66*	0,55*	0,61*	0,38*	0,51*	0,42*	0,39*	
FQLM	pHLM									
	CondLM	X								X
	T _r			X	X	X	X		X	
	%SSVLM				X					X
	IVF5	>		>	>		>	>	>	>
	IVF30	X				X	X	X		
	NGLM	X	X	X	X					X
	PTLM							X		X
	DQLM (rho)	0,71*	0,31*	0,34*	0,35*	0,29*	0,34*	0,13	0,20	
FQAF	%DQOs						X		X	X
	DQO/DBO ₅									
	CNT		X	X	X					X
	CN-NH ₄ ⁺						>			
	CPT		X	X	X		X		X	
	CP-PO ₄ ³⁻	>	>	>	>	X				>
	CCarb		X	X	X	X				X
	CProt									
	CAG	X								
	CAGV						X	X		
	DBO ₅ /NT									
	DBO ₅ /PT						X		X	X
	CS ²⁻									
CSO ₄ ⁻ (rho)	0,47*	0,59*	0,59*	0,62*	0,18	0,31	0,12	0,16		0,42*

*p<0,05

Tal cual se ha indicado anteriormente, en un segundo paso se pretende explorar el resultado de la selección de variables cuando no se aplica su categorización. Se observa un reparto más o menos equitativo entre los tres tipos de variables, a excepción de CT1 y CT2, biorreactores en los que no han sido significativas las variables FQLM (tabla 4.60). La EF y la CMDQOs continúan siendo las más seleccionadas, mientras que otras, como por ejemplo: TRHr, R.rec, pHLM, DQOLM, DQO/DBO₅, CAGV, DBO₅/NT, DBO₅/PT, CProt y CS²⁻, parecen no contribuir a la variabilidad de las bacterias filamentosas. Los coeficientes de correlación de Spearman del conjunto de variables seleccionadas han mostrado diferencias entre biorreactores, correspondiendo los mayores valores a QB y CX (AB y CD). Por otro lado, DN, CT1, CT y CT2 han presentado valores moderados, no siendo significativos en el caso

de estos dos últimos. El número de variables ambientales seleccionadas a partir de la matriz total ha sido muy elevada (15), correspondiéndose con un coeficiente de correlación de 0,60.

Tabla 4.60. Variables ambientales seleccionadas en la rutina BVSTEP y coeficientes de correlación sin categorizar variables y en cada uno de los biorreactores y matriz total, a partir de la abundancia de bacterias filamentosas.

		QB	CXAB	CXCD	CX	DN	CT1	CT2	CT	Matriz total
OPE	EF		X	X	X			X	X	
	CM									X
	CMDQOs	>	X	X	X			X		
	TRHr									
	TRHds					>	>	X		X
	SSLM							X		X
	R.rec									
	ODb					X		X		X
	ODm									X
	ODa									X
FQLM	CO ₃	-	-	-	-	-	X	X	X	
	pHLM									
	CondLM	X								X
	T _r		X			X				
	%SSVLM	X								X
	IVF5	>		>	>	X	>	>	>	>
	IVF30	X								
	NTLM	X								X
	PTLM									X
	DQLM									
FQAF	%DQOs									X
	DQO/DBO ₅									
	CNT		X	X	X					
	CN-NH ₄ ⁺	X					>			
	CPT		X							
	CP-PO ₄ ³⁻		>	>	>		X			>
	CCarb		X			X				X
	CProt									
	CAG	X						X		
	CAGV									
DBO ₅ /NT										
DBO ₅ /PT										
CS ²⁻										
CSO ₄ ⁻²										
(rho)	0,74*	0,71*	0,69*	0,69*	0,40*	0,53*	0,43	0,39		0,60*

*p<0,05

La exploración de los modelos de regresión lineal múltiple multivariante basados en la distancia (DISTLM) se ha realizado empleando procedimientos y criterios parsimoniosos. El enfoque en dicha rutina estadística es similar al planteado anteriormente en la rutina BVSTEP, es decir, en dos pasos. El primero trata de buscar los mejores modelos por tipología de variables (OPE, FQLM y FQAF), explorados de forma individual en cada uno de los biorreactores y en la matriz total. El segundo trata de comparar los modelos anteriores con los construidos sin tener en cuenta la tipología de las variables ambientales, además de comparar la variabilidad individual entre los biorreactores y de estos con la matriz total. El efecto de la multicolinealidad ha sido evaluado a través del gráfico de

dispersión de puntos, eliminando una variable de aquellos pares cuyos coeficientes de correlación de Spearman fueron superiores a 0,85 (marcadas con el símbolo >).

Los resultados indican que la EF, en el caso de las variables OPE, se ha relacionado en cuatro de las nueve combinaciones del test secuencial, correspondiéndose con los porcentajes más elevados de variación explicada de la matriz biológica en CXAB (44,5%), CXCD (44%) y CX (42,8%) (tabla 4.61). Otras variables OPE también han sido seleccionadas de forma común en algunas de las combinaciones, como son: la CMDQOs, el TRHds y la concentración de SSLM, siendo esta última la variable que más ha contribuido a explicar la variabilidad biológica de la matriz total. Por otro lado, la variable CO₃ se ha mostrado significativa en los biorreactores donde fue suministrado el ozono (CT1 y CT2). La variación total explicada más elevada de las variables OPE ha correspondido a CXAB, CXCD, CX y matriz total, siendo las más bajas las correspondientes a DN y CT. En el caso de las variables FQLM, el IVF30 y NTLM han sido las más relevantes al ser las más seleccionadas. Por otro lado, el PTLM y la T^ar también han resultado incluidas en algunas de las combinaciones, explicando esta última variable el mayor porcentaje de variación en DN y CT. La variación total explicada más elevada de las variables FQLM ha correspondido a QB, CXAB, CX y matriz total, siendo las más bajas las correspondientes a DN y CT. Por último y en el caso de las variables FQAF, la selección de las variables en los biorreactores ha sido más heterogénea que en el caso de las variables OPE y FQLM. Destaca especialmente la elevada variación explicada de la CPT en CXAB (35,5%) y CX (36,2%), la CNT en CXCD (40,6%) y la CAG en QB (35,6%). Además, la CS²⁻ ha sido seleccionada en el test secuencial en cuatro combinaciones (matriz total, DN, CT1 y CT), explicando el mayor porcentaje de variación en estos tres últimos. La variación total explicada más elevada de las variables FQAF ha correspondido a QB, CXAB, CXCD, CX y matriz total, siendo las más bajas las correspondientes a DN, CT1, CT2 y CT.

Tabla 4.61. Test secuencial, procedimientos y criterios empleados en la rutina DISTLM por tipología de variable ambiental y en cada uno de los biorreactores y la matriz total, a partir de la abundancia de bacterias filamentosas.

		QB	CXAB	CXCD	CX	DN	CT1	CT2	CT	Matriz total	
OPE	EF		44,5	44,0	42,8					8,0	
	CM					8,5					
	CMDQOs	>	6,1	7,2	5,5						
	TRHr									13,2	
	TRHds	27,6				>	>	9,8		4,4	
	SSLM							15,6	6,8	23,6	
	R. rec	10,9									
	ODb					11,8					
	ODm										
	ODa					9,5					
	CO ₃	-	-	-	-	-	37,3	14,2	24,5		
	Proced.	<i>step.</i>	<i>step.</i>	<i>step.</i>	<i>step.</i>	<i>forw.</i>	<i>forw.</i>	<i>step.</i>	<i>step.</i>	<i>step.</i>	
	Criterio	AIC _c	adj. R ²	AIC _c	BIC	adj. R ²	adj. R ²	AIC _c	AIC _c	BIC	
	% Var. total	38,6	50,6	51,2	48,3	29,8	37,3	39,5	31,7	49,1	
FQLM	pHLM	6,0	7,9								
	CondLM	39,6								5,5	
	T ^{3r}					18,2			19	3,5	
	%SSVLM									20,3	
	IVF5	>		>	>	>	>	>	>	>	
	IVF30	11,7	14,1	10,4	10,5	11,8	28,4	18,7		2,3	
	NTLM		27,6	28,7	26,8		8,6		6,6	2,3	
	PTLM		12		6,9			17,2		10,8	
	DQLM										
	Proced.	<i>step.</i>	<i>forw.</i>	<i>step.</i>	<i>step.</i>	<i>step.</i>	<i>step.</i>	<i>step.</i>	<i>step.</i>	<i>step.</i>	
	Criterio	AIC _c	adj. R ²	AIC _c	BIC	AIC _c	AIC _c	AIC _c	AIC _c	BIC	
	% Var. total	57,3	61,7	39,1	44,1	30,1	37,0	35,3	25,6	44,7	
	FQAF	%DQOs	8,2						15,7		4,2
		DQO/DBO ₅									
CNT		9,5		40,6						3,6	
CN-NH ₄ ⁺							>	>	>	2,6	
CPT			35,5		36,2						
CP-PO ₄ ³⁻		>	>	>	>		>			>	
CCarb			8,5		8,5					8,4	
CProt											
CAG		35,6		7,9	5,8						
CAGV											
DBO ₅ /NT				7,7			16,8				
DBO ₅ /PT										13,2	
CS ²⁻						12,0	14,5		13,4	2,7	
CSO ₄										17,4	
Proced.	<i>step.</i>	<i>step.</i>	<i>step.</i>	<i>step.</i>	<i>forw.</i>	<i>step.</i>	<i>forw.</i>	<i>step.</i>	<i>step.</i>		
Criterio	AIC _c	AIC _c	AIC _c	BIC	adj. R ²	AIC _c	adj. R ²	BIC	BIC		
% Var.	53,3	43,9	56,2	50,5	12,0	31,2	15,7	20,0	51,9		

De forma similar a los resultados encontrados en la rutina BVSTEP (tabla 4.60), el número de variables ambientales seleccionadas (11) aumenta considerablemente en la matriz total cuando no se tiene en cuenta su tipología (tabla 4.62). Además, el número de variables OPE y FQAF seleccionadas en el test secuencial disminuye ligeramente, especialmente en estas últimas. Las variables que más han contribuido a explicar la variabilidad de la comunidad de bacterias filamentosas han sido las siguientes: la EF en CX (AB y CD), la CondLM en QB, la T^{3r} en DN, la CO₃ en CT1 y CT, el IVF30 en CT2 y los SSLM en la matriz total. La variación total explicada ha sido en general moderada-

alta, a excepción de DN, que ha sido inferior respecto al resto. Además, el número de variables seleccionadas en el test secuencial ha sido muy diferente entre biorreactores.

Tabla 4.62. Test secuencial, procedimientos y criterios empleados en la rutina DISTLM del total de variables ambientales y en cada uno de los biorreactores y la matriz total, a partir de la abundancia de bacterias filamentosas.

		QB	CXAB	CXCD	CX	DN	CT1	CT2	CT	Matriz total	
OPE	EF		44,5	44,0	42,8						
	CM	>								1,8	
	CM (DQO)								6,8		
	TRHr									13,2	
	TRHds					>	>				
	SSLM			6,2				11	5,3	23,6	
	R. rec										
	ODb										
	ODm										
	ODa										
	CO ₃	-	-	-	-	-	37,3		24,9		
	FQLM	pHLM						7,5			
		CondLM	39,6								1,3
		T _{tr}	5,3	8,5		6,3	18,2			6,5	2,4
%SSVLM										4,6	
IVF5		>		>	>	13,0	>	>	>	>	
IVF30		11,7			4,8			18,1		2,0	
NTLM							10,8		8,0		
PTLM					4,2			17,2		1,5	
FQAF	DQLM										
	%DQOs	8,1									
	DQO/DBO ₅										
	CNT			10,6						3,7	
	CN-NH ₄ ⁺						>	>	>	3,8	
	CPT								5,6		
	CP-PO ₄ ³⁻	>	>	>	>		>			>	
	CCarb				6,9				3,5	8,0	
	CProt										
	CAG										
	CAGV										
	DBO ₅ /NT										
	DBO ₅ /PT										
	CS ²⁻										
CSO ₄											
Proced.	<i>step.</i>	<i>step.</i>	<i>step.</i>	<i>step.</i>	<i>step.</i>	<i>step.</i>	<i>step.</i>	<i>step.</i>	<i>step.</i>	<i>step.</i>	
Criterio	AIC _c	AIC _c	AIC _c	BIC	AIC _c	AIC _c	AIC _c	AIC _c	BIC	BIC	
% Var.	64,7	53,0	60,8	64,9	31,3	55,6	46,2	60,6	65,7		

Descripción de los modelos de regresión lineal múltiple multivariante basados en la distancia

Los modelos que incluyen las variables ambientales sin categorizar excluyen de los mismos a variables con un elevado porcentaje de variación explicada en los modelos en los cuales se tiene en cuenta la categoría, por ello, se ha optado principalmente por la descripción de estos últimos (tabla 4.63). Debido a que los biorreactores CXAB, CXCD y la combinación de ambos (CX) han mostrado en general resultados similares en el test secuencial, esta última combinación ha sido utilizada para la construcción de los modelos en la EDAR CX. En el caso de las variables

OPE, la combinación CT se ha considerado más adecuada que CT2 y CT1 por presentar variables similares en el primer caso, y en el segundo por la selección de una única variable en el modelo. En el caso de las variables FQLM, la combinación CT se ha seleccionado respecto a CT2 y CT1 debido a que la variable IVF30 no se considera relevante, al no mostrarse valores elevados durante el episodio de *foaming* filamentoso detectado. En el caso de las variables FQAF, se ha seleccionado la combinación correspondiente a CT1, puesto que CT2 y CT mostraron tan solo una variable en el test secuencial. En el caso de DN, no ha sido posible construir un modelo basado en las variables FQAF debido al escaso número de variables seleccionadas (1). Los correspondientes a la matriz total FQAF y la matriz total de variables sin categorizar no han sido procesados debido al número elevado de variables seleccionadas.

Tabla 4.63. Porcentaje de variación explicada de la abundancia de bacterias filamentosas por los ejes individuales en la rutina DISTLM, a partir de las variables ambientales categorizadas de los distintos biorreactores y la matriz total.

	Eje	Variación explicada del modelo ajustado		Variación explicada del total de la variación			
		Individual	Acumulada	Individual	Acumulada		
OPE	QB	1	92,82	92,82	35,78	35,78	
		2	7,18	100	2,77	38,55	
	CX	1	91,15	91,15	44,01	44,01	
		2	8,85	100	4,27	48,29	
	DN	1	76,09	76,09	22,69	22,69	
		2	22,87	98,96	6,82	29,51	
		3	1,04	100	0,31	29,82	
	CT	1	81,28	81,28	25,77	25,77	
		2	18,72	100	5,94	31,71	
	Total	1	54,68	54,68	26,84	26,84	
		2	26,90	81,58	13,20	40,04	
		3	14,83	96,04	7,28	47,32	
		4	3,6	100	1,77	49,09	
	FQLM	QB	1	84,30	84,30	48,33	48,33
			2	10,14	94,44	5,81	54,15
			3	5,56	100	3,19	57,34
CX		1	81,94	81,94	36,14	36,14	
		2	10,89	92,83	4,80	40,95	
		3	7,17	100	3,16	44,11	
DN		1	61,49	61,49	18,49	18,49	
		2	38,51	100	11,58	30,08	
CT		1	75,00	75,00	19,21	19,21	
		2	25,00	100	6,40	25,62	
Total		1	61,28	61,28	27,38	27,38	
		2	20,60	81,88	9,20	36,59	
		3	12,53	94,41	5,60	42,19	
FQAF		QB	1	76,31	76,31	40,65	40,65
			2	19,28	96,29	10,64	51,29
	3		3,71	100	1,98	53,27	
	CX	1	86,78	86,78	43,80	43,8	
		2	11,96	98,75	6,04	49,84	
	CT1	1	100,28	100,28	31,32	31,32	
		2	-0,28	100	-0,09	31,23	

a) Modelos de interpretación ambiental a partir de las variables operacionales (OPE)

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes a las variables OPE de QB indican una correlación positiva elevada del TRHds con el dbRDA1 y dbRDA2, así como positiva y negativa elevada de la R. rec. con el dbRDA1 y dbRDA2, respectivamente (tabla 4.64). Las bacterias filamentosas más relacionadas ($r > 0,45$) con valores altos del TRHds y la R.rec. son: *M. parvicella*, GALO, *N. limicola* III, *N. limicola* II Chl, *Isosphaera* sp. y *Gordonia* sp., siendo moderados en el caso de *Trichococcus* sp., *Ca. 'A. europaea'*, *T. japonica* y Tipo 0803-I. El diagrama de burbujas expresado en la figura del dbRDA refleja que la abundancia de dichos organismos se encuentra influenciada por valores de la R. rec. y el TRHds superiores a 1,6 y 6 horas, respectivamente (figura 4.71). Por el contrario, los tipos 0803/0914, 0092, 0803-D y 0092-A se relacionan ($r > 0,40$) de forma inversa con dichas variables. Por último, el tipo 021N se relaciona ($r = 0,45$) en el dbRDA2 con valores del TRHds por encima de 6 horas y valores de la R. rec. inferiores a 1,6 horas.

Tabla 4.64. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables OPE y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dbRDA en QB.

Biorreactor	Variabes	dbRDA1	dbRDA2
QB	TRHds	0,707	0,707
	R. rec	0,707	-0,707
	Tipo 021N	-0,27	0,45
	<i>M. parvicella</i>	0,61	0,21
	GALO	0,76	-0,11
	Tipo 0803/0914	-0,44	0,37
	Tipo 0092	-0,60	-0,03
	<i>N. limicola</i> III	0,65	0,09
	<i>Trichococcus</i> sp.	0,47	0,30
	<i>Ca. 'A. europaea'</i>	0,42	0,01
	<i>N. limicola</i> II Chl	0,63	0,01
	<i>T. japonica</i>	0,51	-0,04
	<i>Isosphaera</i> sp.	0,86	0,01
	Tipo 0803-I	0,40	-0,10
	Tipo 0803-D	-0,48	0,34
	Tipo 0092-A	-0,77	-0,05
	<i>Gordonia</i> sp.	0,75	0,08

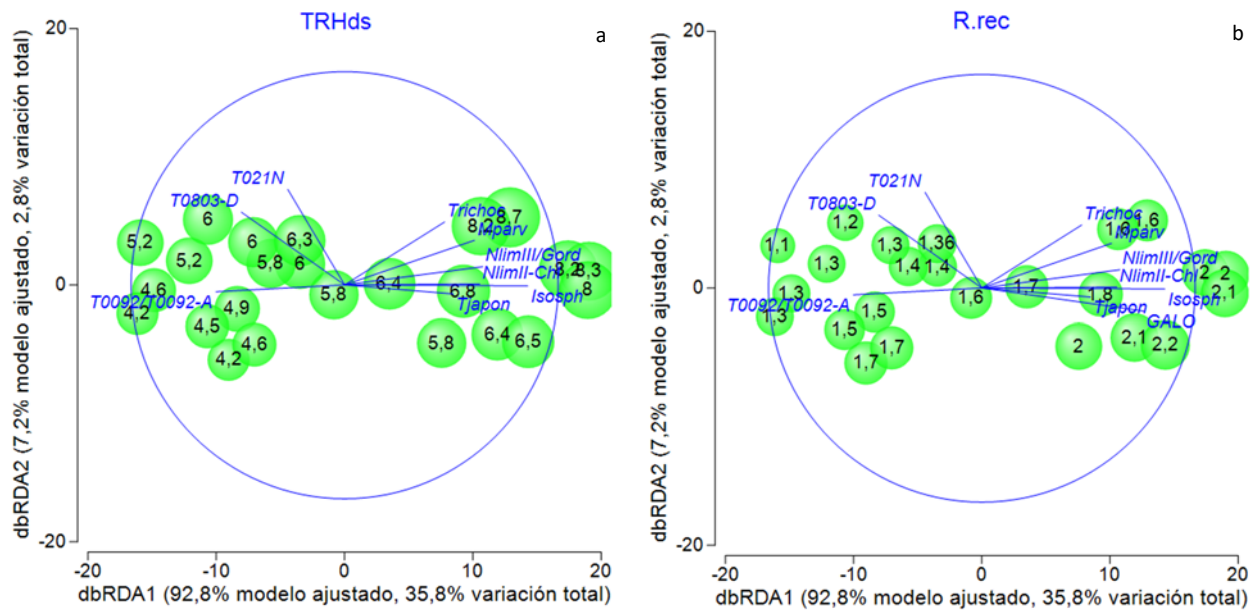


Figura 4.71. Gráfico de burbujas del TRHds (a) y la R. rec. (b) en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables OPE y bacterias filamentosas en QB. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de -0,45 y

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de variables OPE de CX indican una elevada correlación negativa de la EF y SSLM con el dbRDA1, y positiva de la CMDQOs con el dbRDA2 (tabla 4.65). Las bacterias filamentosas que más se relacionan ($r > 0,50$) con valores bajos de la EF son las siguientes: tipo 0411, *M. parvicella*, *N. limicola* III, CX-03, CX-02, *Trichococcus* sp., *Ca.* 'M. batavus', *N. limicola* II *Chl.*, *Ca.* 'M. parvicella' (MPA645) y *Microthrix* (MPA1410). El diagrama de burbujas de la EF expresado en la figura del dbRDA indica que la abundancia de dichas bacterias se encuentra influenciada por valores de la EF inferiores a 10 días (figura 4.72). De forma contraria, las bacterias tipo 0581, tipo 0041, tipo 0092, *Ca.* 'A. europaea', tipo 0803-cal, tipo 0092-A y tipo 0092-B parecen encontrarse asociadas ($r > -0,50$) con valores de la EF superiores a 10 días. Por otro lado, el tipo 0803-cal, el tipo 0803-I, HHY y *Ca.* 'M. parvicella' (MPA60) se relacionan ($r > 0,45$) en el dbRDA2 con valores de la CMDQOs superiores a 0,16 Kg DQOs/Kg SSVLM.d, aproximadamente.

Tabla 4.65. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables OPE y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dbRDA en CX.

Biorreactor	Variabes	dbRDA1	dbRDA2
CX	EF	-0,900	0,436
	CMDQOs	0,436	0,900
	Tipo 0411	0,70	-0,11
	<i>M. parvicella</i>	0,77	0,07
	Tipo 0581	-0,73	0,06
	Tipo 0041	-0,63	0,26
	Tipo 0092	-0,77	-0,04
	<i>N. limicola</i> III	0,63	-0,04
	<i>H. hydrossis</i>	-0,47	0,16
	CX-03	0,55	-0,36
	CX-02	0,70	-0,28
	<i>Trichococcus</i> sp.	0,45	0,24
	<i>Ca. 'A. europaea'</i>	-0,50	-0,01
	<i>Ca. 'M. batavus'</i>	0,64	-0,04
	<i>N. limicola</i> II <i>Chl.</i>	0,77	0,11
	Tipo 0803-cal	-0,57	0,48
	Tipo 0803-I	0,06	0,45
	Tipo 0092-A	-0,74	0,01
	Tipo 0092-B	-0,55	-0,04
	HHY	0,12	0,48
	MPA645	0,66	0,19
	MPA1410	0,70	0,04
	MPA60	0,25	0,45

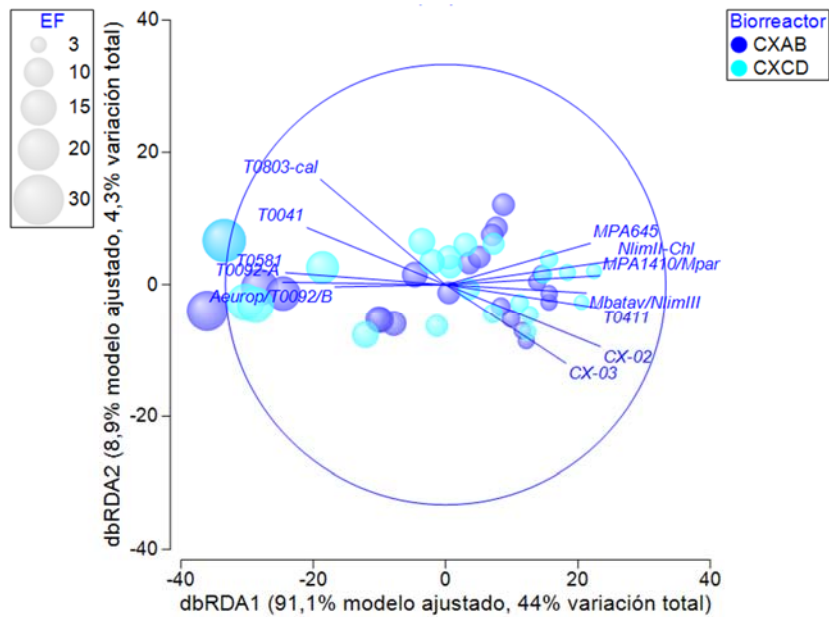


Figura 4.72. Gráfico de burbujas de la EF en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables OPE y bacterias filamentosas en CX. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,50 y -0,50.

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de variables OPE de CT indican una elevada correlación positiva de la CO_3 y negativa de los SSLM con el dbRDA1 y dbRDA2, respectivamente (tabla 4.66). Las bacterias que más se relacionan ($r > 0,45$) en el dbRDA1 con valores altos de la CO_3 son GALO y *Gordonia* sp., mientras que de forma inversa ($r > -0,45$) lo hacen: tipo 0803/0914, *N. limicola* I, *H. hydrossis* y tipo 0803-I (figura 4.73). Por otro lado, *Thiothrix* (I, II) y *N. limicola* III se asocian ($r > 0,40$) con bajos valores de SSLM en el dbRDA2.

Tabla 4.66. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables OPE y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dbRDA en CT.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2
CT	CO_3	0,904	-0,428
	SSLM	0,428	-0,904
	<i>Thiothrix</i> (I, II)	-0,17	0,43
	Tipo 021N*	-0,40	0,08
	GALO	0,45	-0,09
	Tipo 0803/0914	-0,54	0,08
	Tipo 0092	-0,42	-0,11
	<i>N. limicola</i> III	-0,30	0,43
	<i>N. limicola</i> I	-0,85	-0,14
	<i>H. hydrossis</i>	-0,52	0,09
	Tipo 1851	-0,44	0,08
	Tipo 0803-I	-0,48	0,01
	Tipo 0803-D	0,40	0,22
	<i>Gordonia</i> sp.	0,51	-0,05

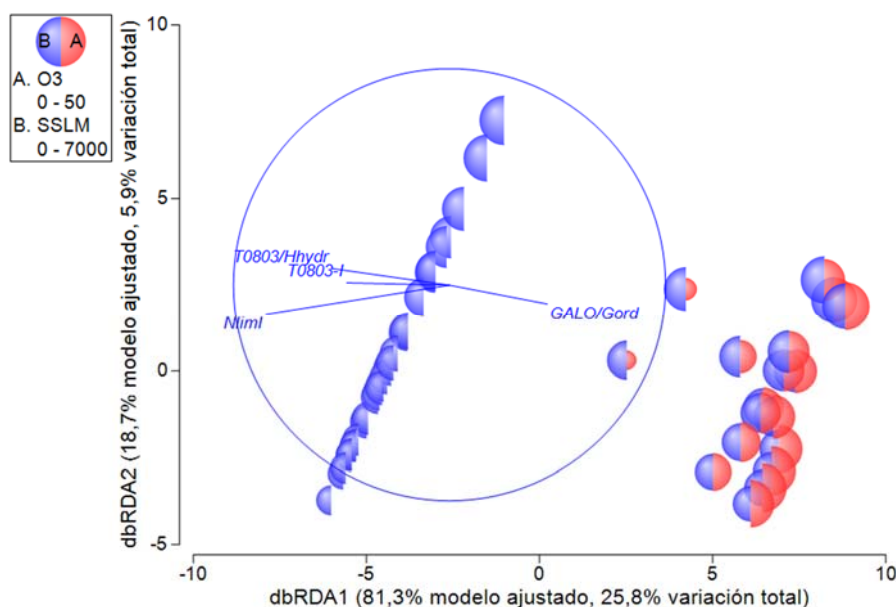


Figura 4.73. Gráfico de burbujas de la CO_3 y los SSLM en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables FQLM y bacterias filamentosas en CT. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,45 y -0,45.

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de variables OPE de DN indican una correlación positiva y negativa moderada del ODb con el dbRDA1 y dbRDA3, respectivamente, positiva del ODa con ambos ejes y positiva elevada de la CM con el dbRDA2 (tabla 4.67). Las bacterias asociadas ($r > 0,45$) con valores altos del ODb y ODa son: *M. parvicella*, tipo 0041, *Trichococcus* sp., *Ca. 'M. batavus'* y *T. japonica*. El diagrama de burbujas indica que su abundancia se encuentra influenciada por ODb $> 68-70\%$ (figura 4.74). De forma contraria, GALO, *Isosphaera* sp., *T. fructosivorans* y *Thiothrix* sp. (G123T) se asocian ($r > -0,45$) a valores inferiores. Por otro lado, las bacterias tipo 0092-A y tipo 0914-a se asocian con valores de la CM inferiores a 0,16 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d.

Tabla 4.67. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables OPE y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dbRDA en DN.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3
DN	ODb	0,662	-0,266	-0,680
	ODa	0,643	-0,279	0,690
	CM	0,385	0,923	0,013
	<i>M. parvicella</i>	0,60	0,07	-0,06
	GALO	-0,50	0,15	-0,30
	Tipo 0041	0,49	-0,16	-0,22
	<i>Trichococcus</i> sp.	0,52	0,11	-0,12
	<i>Ca. 'M. batavus'</i>	0,48	-0,07	0,01
	<i>T. japonica</i>	0,69	-0,20	-0,21
	<i>Isosphaera</i> sp.	-0,42	-0,32	0,11
	<i>T. fructosivorans</i>	-0,53	-0,17	-0,16
	G123T	-0,60	-0,17	-0,16
	Tipo 0092-A	-0,37	-0,40	0,03
	Tipo 0914-a	0,34	-0,53	-0,01

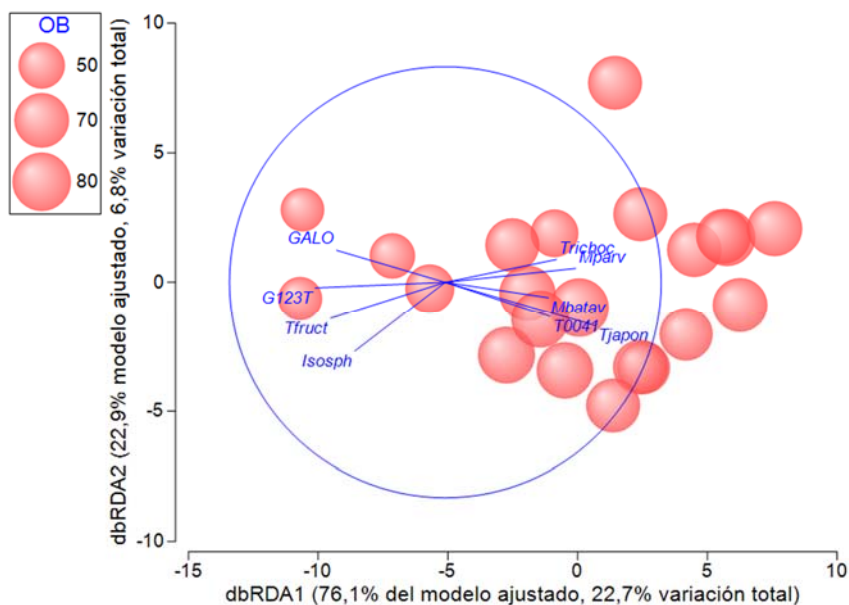


Figura 4.74. Gráfico de burbujas del ODb en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables OPE y bacterias filamentosas en DN. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,45 y -0,45.

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de variables OPE de la matriz total indican una correlación negativa elevada de los SSLM y positiva moderada del TRHds con el dbRDA1, así como positiva elevada del TRHr y la EF con el dbRDA2 y dbRDA3, respectivamente (tabla 4.68). Los microorganismos filamentosos que más se relacionan ($r > -0,50$) con valores elevados de los SSLM y bajos del TRHds en el dbRDA1 son los siguientes: GALO, tipo 0803/0914, tipo 0092, tipo 1851, tipo 0803-cal, tipo 0803-I, tipo 0803-D y tipo 0092-A. El diagrama de burbujas expresado en la figura del dbRDA indica que la abundancia de dichos organismos se encuentra influenciada por valores de SSLM por encima de 2000 mg/L (figura 4.75). Contrariamente, el tipo 0411 se asocia ($r = 0,52$) con valores de SSLM inferiores. Por otro lado, valores del TRHr superiores a 10 horas se han relacionado ($r > 0,45$) en el dbRDA2 con las siguientes bacterias filamentosas: *Thiothrix* (I, II), *T. nivea*, *Thiothrix* sp. (G123T) y tipo 0092-B, mientras que con valores inferiores lo han hecho *N. limicola* I ($r = -0,65$) y tipo 1851 ($r = -0,65$) (figura 4.76). La relación directa encontrada entre la EF y el morfotipo 0581 ($r = 0,51$) y tipo 0092-B ($r = 0,42$) en el dbRDA3 indica que estos microorganismos se encuentran influenciados por valores superiores a 10 días.

Tabla 4.68. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables OPE y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dbRDA en la matriz total.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3
TOTAL	SSLM	-0,740	-0,076	-0,124
	TRHr	0,018	0,917	-0,396
	EF	-0,311	0,385	0,858
	TRHds	0,601	0,079	0,303
	Tipo 0411	0,52	-0,29	-0,11
	<i>Thiothrix</i> (I, II)	-0,18	0,66	-0,12
	Tipo 0581	0,29	-0,09	0,51
	GALO	-0,54	-0,29	-0,37
	Tipo 0803/0914	-0,62	0,01	-0,04
	Tipo 0092	-0,68	-0,07	0,30
	<i>N. limicola</i> I	0,20	-0,65	-0,22
	Tipo 1851	-0,62	-0,65	-0,22
	<i>T. nivea</i>	-0,07	0,71	-0,05
	<i>T. fructosivorans</i>	-0,40	0,32	0,14
	G123T	-0,13	0,58	-0,04
	Tipo 0803-cal	-0,61	0,07	0,17
	Tipo 0803-I	-0,53	0,17	-0,15
	Tipo 0803-D	-0,59	0,21	-0,17
	Tipo 0092-A	-0,79	-0,12	0,20
	Tipo 0092-B	-0,14	0,47	0,42
	Tipo 0914-a	-0,42	0,01	-0,13

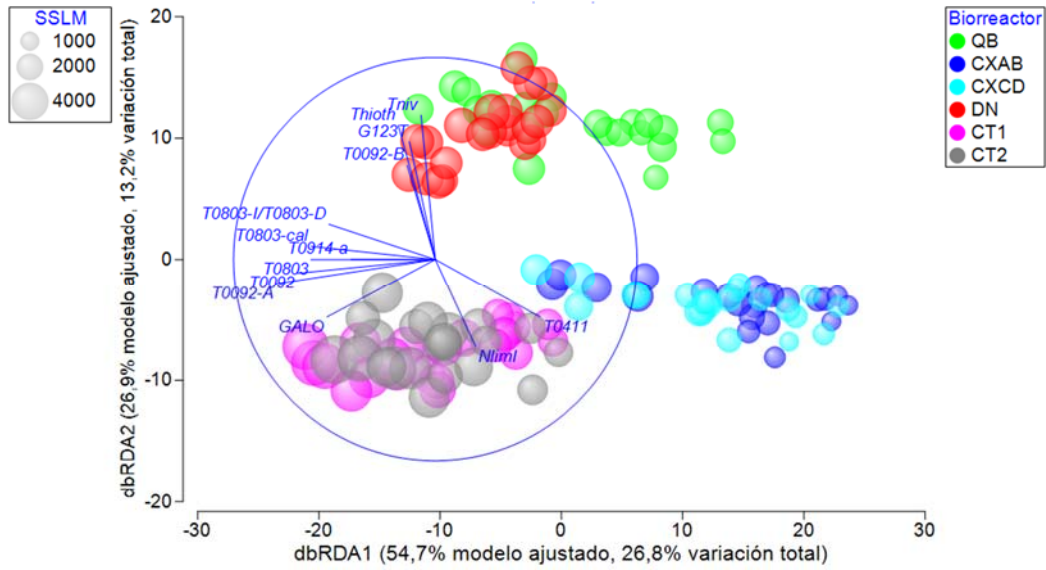


Figura 4.75. Gráfico de burbujas de los SSLM en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables OPE y bacterias filamentosas a partir de la matriz total. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,45 y -0,45.

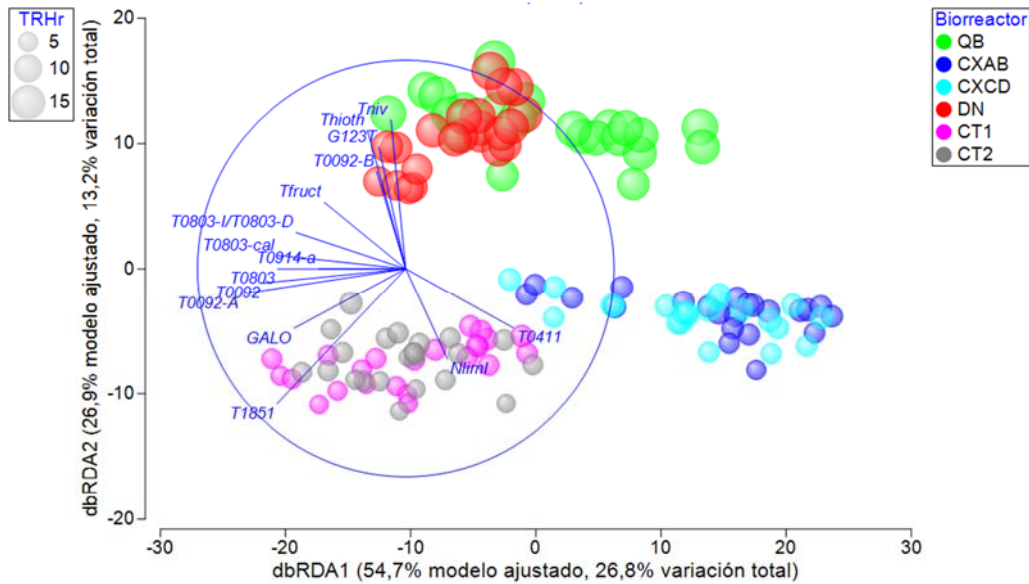


Figura 4.76. Gráfico de burbujas del TRHr en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables OPE y bacterias filamentosas a partir de la matriz total. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,45 y -0,45.

b) Modelos de interpretación ambiental a partir de las variables fisicoquímicas del licor mezcla (FQLM)

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de variables FQLM del biorreactor QB indican una correlación positiva elevada de la CondLM y la T^ar con el dbRDA1 y dbRDA2, respectivamente, y negativa moderada del IVF30 con el dbRDA3 (tabla 4.69). Las bacterias filamentosas que más se relacionan ($r > 0,50$) con valores altos de la CondLM son: *M. parvicella*, GALO, *N. limicola* III, *Trichococcus* sp., *N. limicola* III-Chl., *T. japonica*, *Isosphaera* sp., tipo 0803-I, *Gordonia* sp. y *H. hydrossis* (HHY). En el diagrama de burbujas de la figura del dbRDA se observa que la abundancia de dichos organismos se encuentra influenciada por valores de la CondLM por encima de 2000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (figura 4.77). De forma contraria, las bacterias *M. parvicella**, tipo 0041, tipo 0092, tipo 0803-D y tipo 0092-A se encuentran asociadas ($r > -0,45$) con valores inferiores de la CondLM. Por otro lado, los coeficientes de correlación encontrados con la T^ar (dbRDA2) han sido generalmente bajos, destacando la relación de *T. japonica* ($r = 0,44$), tipo 0914-a ($r = 0,52$) y *H. hydrossis* (HHY) ($r = 0,46$) con elevada T^ar, mientras que el tipo 021N lo hace con bajos valores. En el caso del dbRDA3, relacionado con el IVF30, los resultados indican una relación directa con el tipo 0803/0914 ($r = -0,51$) y el tipo 0092-A ($r = -0,44$) e inversa con *Ca. 'A. europaea'* ($r = 0,47$).

Tabla 4.69. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQLM y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dbRDA en el biorreactor QB.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3
QB	CondLM	0,784	-0,116	0,609
	IVF30	-0,582	-0,477	-0,658
	T^ar	-0,215	0,871	0,442
	Tipo 021N	-0,20	-0,41	-0,23
	<i>M. parvicella</i>	0,81	0,06	-0,29
	<i>M. parvicella</i> *	-0,52	0,22	-0,25
	GALO	0,91	0,05	-0,09
	Tipo 0803	-0,41	0,05	-0,51
	Tipo 0041	-0,54	0,06	-0,14
	Tipo 0092	-0,61	0,15	-0,17
	<i>N. limicola</i> III	0,57	0,18	-0,13
	<i>Trichococcus</i> sp.	0,58	-0,24	-0,08
	<i>Ca. 'A. europaea'</i>	0,18	0,07	0,47
	<i>N. limicola</i> III-Chl.	0,70	-0,05	0,07
	<i>T. japonica</i>	0,55	0,44	-0,09
	<i>Isosphaera</i> sp.	0,93	0,04	0,09
	Tipo 0803-I	0,53	0,08	0,04
	Tipo 0803-D	-0,45	0,26	-0,06
	Tipo 0092-A	-0,75	0,15	-0,44
	Tipo 0914-a	0,03	0,52	0,33
<i>Gordonia</i> sp.	0,95	0,02	-0,16	
HHY	0,50	0,46	-0,07	

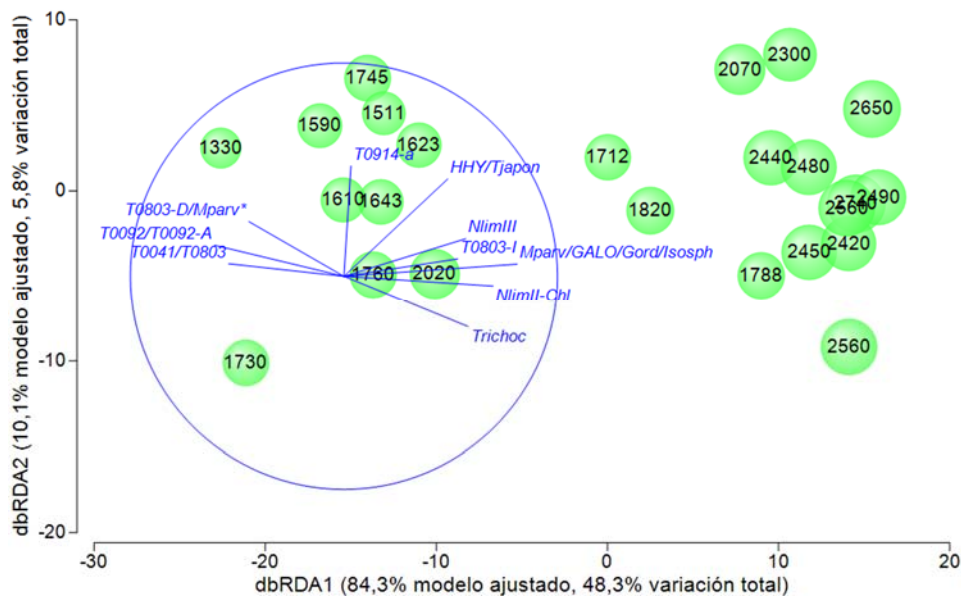


Figura 4.77. Gráfico de burbujas de la CondLM en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables FQLM y bacterias filamentosas en QB. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,50 y -0,45.

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de variables FQLM de la EDAR CX indican una correlación positiva elevada del NTLM con el dbRDA1 y negativa del IVF30 y PTLM con el dbRDA2 y dbRDA3, respectivamente (tabla 4.70). Las bacterias filamentosas que más se relacionan ($r > 0,45$) con valores elevados del NTLM son las siguientes: tipo 0411, *M. parvicella*, *N. limicola* III, CX-03, CX-02, *Trichococcus* sp., *Ca. 'M. batavus'*, *N. limicola* II-*Chl.*, *Ca. 'M. parvicella'* (MPA645) y *Microthrix* (MPA1410). El diagrama de burbujas de la figura del dbRDA indica que la abundancia de dichos organismos se encuentra influenciada por valores del NTLM por encima de 100 mg/g SSVLM, aproximadamente (figura 4.78). De forma contraria, las bacterias tipo 0581, tipo 0041, tipo 0092, *Ca. 'A. europaea'*, tipo 0803-cal, tipo 0803-D, tipo 0803-I, tipo 0092-A y tipo 0092-B se encuentran relacionadas ($r > 0,45$) con valores inferiores. Por otro lado, *Ca. 'M. parvicella'* (MPA60) se asocia a valores del IVF30 elevados en el dbRDA2, mientras que la bacteria tipo 0803-I lo hace con valores bajos del PTLM en el dbRDA3.

Tabla 4.70. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQLM y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dbRDA en la EDAR CX.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3
CX	NTLM	0,725	0,669	0,166
	IVF30	0,525	-0,700	0,495
	PTLM	0,446	-0,272	-0,853
	Tipo 0411	0,65	0,24	-0,28
	<i>M. parvicella</i>	0,66	-0,10	0,17
	Tipo 0581	-0,69	0,07	-0,01
	Tipo 0041	-0,62	-0,22	0,28
	Tipo 0092	-0,67	0,04	-0,05
	<i>N. limicola</i> III	0,67	-0,09	0,16
	<i>H. hydrossis</i>	-0,44	-0,21	-0,12
	CX-03	0,59	0,33	-0,05
	CX-02	0,80	0,18	-0,10
	<i>Trichococcus</i> sp.	0,45	-0,27	-0,26
	<i>Ca. 'A. europaea'</i>	-0,45	0,12	0,22
	<i>Ca. 'M. batavus'</i>	0,59	-0,07	0,01
	<i>N. limicola</i> II-Chl.	0,70	-0,12	0,03
	Tipo 0803-cal	-0,51	-0,30	-0,03
	Tipo 0803-I	-0,34	-0,08	0,45
	Tipo 0803-D	-0,51	-0,23	0,19
	Tipo 0092-A	-0,58	-0,04	-0,06
	Tipo 0092-B	-0,46	-0,02	0,06
	MPA645	0,62	-0,13	0,04
	MPA1410	0,50	0,08	0,19
	MPA60	0,22	-0,57	0,24

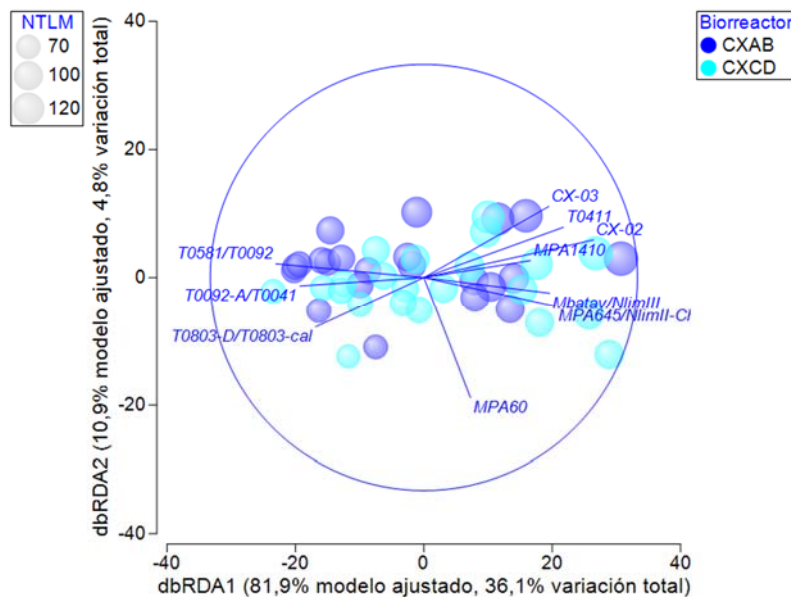


Figura 4.78. Gráfico de burbujas del NTLM en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables FQLM y bacterias filamentosas en CX. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,45

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de variables FQLM de la EDAR CT indican una correlación positiva de la T^a_r y negativa del NTLM con el dbRDA1 y dbRDA2, respectivamente (tabla 4.71). Las bacterias filamentosas más relacionados ($r > 0,40$) en el dbRDA1 con valores de la T^a_r superiores a 20 °C son: tipo 0803/0914, tipo 0092, *N. limicola* I, *H. hydrossis* y tipo 0803-I, mientras que con valores inferiores lo hacen GALO ($r = -0,63$) y *Gordonia* sp. ($r = -0,52$). Por último, *T. fructosivorans* se asocia con valores bajos del NTLM en el dbRDA2.

Tabla 4.71. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQLM y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dbRDA en la EDAR CT.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2
CT	T^a_r	0,995	-0,095
	NTLM	0,095	-0,995
	GALO	-0,63	0,19
	Tipo 0803/0914	0,49	0,21
	Tipo 0092	0,59	0,29
	<i>N. limicola</i> I	0,50	-0,15
	<i>H. hydrossis</i>	0,42	-0,10
	<i>T. fructosivorans</i>	-0,35	0,46
	Tipo 0803-I	0,41	0,02
	<i>Gordonia</i> sp.	-0,52	0,16

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de variables FQLM de DN indican una correlación positiva elevada de la T^a_r y el IVF30 con el dbRDA1 y dbRDA2, respectivamente (tabla 4.72). Las bacterias filamentosas que más se relacionan ($r > 0,45$) con valores elevados de la T^a_r son: tipo 0803/0914, tipo 0041, *Trichococcus* sp. y tipo 0803-D. El diagrama de burbujas reflejado en la figura del dbRDA indica que la abundancia de dichos organismos se encuentra influenciada por valores de la T^a_r superiores a 20 °C, aproximadamente (figura 4.79). De forma contraria, *Thiothrix* (I, II), *Isosphaera* sp. *T. fructosivorans* y *Thiothrix* (G123I) parecen encontrarse asociados ($r > -0,45$) a valores inferiores. Por otro lado, las bacterias tipo 0092, *N. limicola* III, *T. nivea* y tipo 0092-B parecen relacionarse ($r > -0,45$) con valores bajos del IVF30, mientras que el tipo 021N lo hace ($r = 0,40$) con valores elevados.

Tabla 4.72. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQLM y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dbRDA en el biorreactor DN.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2
DN	T^{ar}	0,995	-0,180
	IVF30	0,180	0,984
	<i>Thiothrix</i> (I, II)	-0,65	0,29
	Tipo 021N	0,26	0,40
	GALO	-0,40	0,18
	Tipo 0803/0914	0,62	0,07
	Tipo 0041	0,52	0,02
	Tipo 0092	-0,04	-0,57
	<i>N. limicola</i> III	0,44	-0,55
	<i>H. hydrossis</i>	0,44	-0,05
	<i>Trichococcus</i> sp.	0,50	0,44
	<i>Isosphaera</i> sp.	-0,45	0,13
	<i>T. nivea</i>	0,08	-0,50
	<i>T. fructosivorans</i>	-0,76	0,27
	G123T	-0,62	-0,10
	Tipo 0803-D	0,47	-0,41
	Tipo 0092-B	-0,32	-0,61

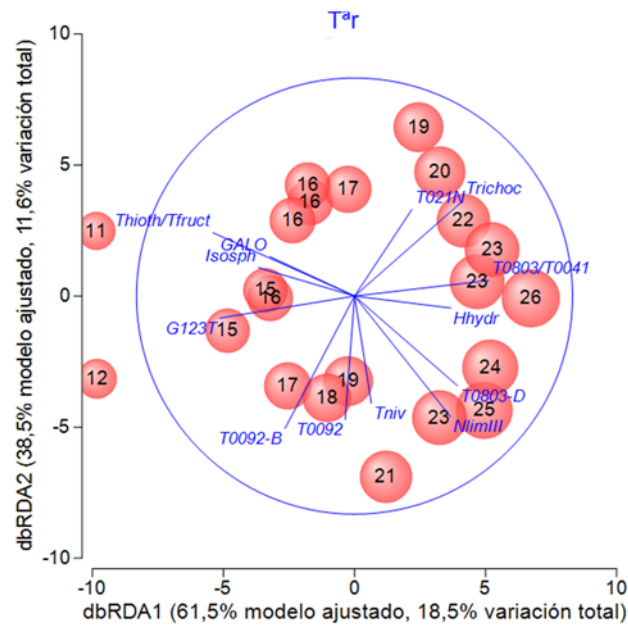


Figura 4.79. Gráfico de burbujas de la T^{ar} en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables FQLM y bacterias filamentosas en DN. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,45 y -0,45.

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de variables FQLM de la matriz total indican una correlación positiva elevada del PTLM y la T^{ar} con el dbRDA2 y dbRDA3, respectivamente, siendo moderados los coeficientes de correlación del resto de variables (%SSVLM, CondLM, IVF30 y NTLM) (tabla 4.73). Las bacterias filamentosas que más se relacionan ($r > 0,45$) en el dbRDA1 con valores elevados del %SSVLM y NTLM y bajos de la CondLM son el tipo 0041 y tipo 1701, mientras que de forma inversa lo hacen las siguientes: GALO, tipo 0803/0914, tipo 0092, tipo 1851, tipo 0803-cal, tipo 0803-D, tipo 0803-I, tipo 0092-A y tipo 0914a. Por otro lado, elevados valores del %SSVLM y PTLM se asocian ($r > 0,45$) con la mayor abundancia de GALO y 1851, mientras que el tipo 0092-B ($r = -0,63$) lo ha hecho con valores bajos. Por último, las bacterias *Thiothrix* (I, II) y *M. parvicella* se han encontrado asociadas a valores bajos de la T^{ar}, especialmente esta última.

Tabla 4.73. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQLM y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dbRDA en la matriz total.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3
TOTAL	%SSVLM	0,498	0,575	0,143
	PTLM	-0,453	0,746	0,132
	CondLM	-0,514	0,136	-0,352
	T ^{ar}	-0,110	0,016	0,742
	NTLM	0,520	0,236	-0,207
	IVF30	0,006	0,194	-0,495
Tipo 0411		0,45	0,35	-0,08
Tipo 1701		0,55	-0,07	0,10
<i>Thiothrix</i> (I, II)		-0,14	-0,29	-0,40
<i>M. parvicella</i>		-0,10	0,18	-0,50
Tipo 0581		0,40	-0,29	0,27
GALO		-0,59	0,45	-0,04
Tipo 0803/0914		-0,64	-0,07	0,13
Tipo 0092		-0,64	-0,26	0,11
<i>H. hydrossis</i>		0,09	-0,41	0,08
Tipo 1851		-0,72	0,50	0,18
Tipo 0803-cal		-0,58	-0,21	0,15
Tipo 0803-I		-0,61	-0,10	-0,0
Tipo 0803-D		-0,58	-0,15	0,07
Tipo 0092-A		-0,76	-0,14	0,06
Tipo 0092-B		-0,09	-0,63	-0,27
Tipo 0914-a		-0,47	0,01	0,05

b) Modelos de interpretación ambiental a partir de las variables fisicoquímicas del afluente (FQAF)

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de variables FQAF del biorreactor QB indican una correlación positiva elevada de la CAG y CNT con el dbRDA1, y negativa del %DQOs con el dbRDA2 (tabla 4.74). Las bacterias filamentosas que más se relacionan ($r > 0,50$) en el dbRDA1 con valores de la CAG y CNT superiores a 15 y 50 g/Kg SSVLM.d., respectivamente, son las siguientes: *M. parvicella*, GALO, *N. limicola* III, *Trichococcus* sp., *N. limicola* II-Chl., *T. japonica*, *Isosphaera* sp. y *Gordonia* sp. (figura 4.80). Por el contrario, tipo 0092,

tipo 0803-cal, tipo 0803-D y tipo 0092-A lo hacen ($r > -0,50$) de forma inversa. Por otro lado, *T. fructosivorans*, *T. nivea* y tipo 0914-a parecen asociarse ($r > -0,45$) en el dbRDA2 con valores del %DQOs superiores al 55%, mientras que el tipo 1863 y *N. limicola* I lo hacen ($r > 0,45$) en el dbRDA3, coincidiendo en este caso con elevada CNT.

Tabla 4.74. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQAF y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dbRDA en el biorreactor QB.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3
QB	CAG	0,706	-0,609	-0,401
	%DQOs	-0,240	-0,710	0,664
	CNT	0,700	0,359	0,631
Tipo 1863		0,24	-0,36	0,45
<i>M. parvicella</i>		0,77	-0,05	-0,18
GALO		0,75	-0,07	-0,01
Tipo 0041		-0,47	-0,11	0,04
Tipo 0092		-0,74	-0,11	0,04
<i>N. limicola</i> III		0,56	-0,28	0,01
<i>N. limicola</i> I		-0,39	-0,12	0,45
<i>Trichococcus</i> sp.		0,63	0,35	-0,08
<i>N. limicola</i> II-Chl.		0,79	-0,04	0,11
<i>T. japonica</i>		0,51	-0,30	0,07
<i>Isosphaera</i> sp.		0,87	-0,04	0,08
<i>T. nivea</i>		0,36	-0,56	-0,17
<i>T. fructosivorans</i>		-0,18	-0,46	0,12
Tipo 0803-cal		-0,58	-0,23	0,05
Tipo 0803-D		-0,54	-0,39	0,01
Tipo 0092-A		-0,73	-0,21	-0,39
Tipo 0914-a		-0,07	-0,57	0,28
<i>Gordonia</i> sp.		0,79	-0,01	-0,02

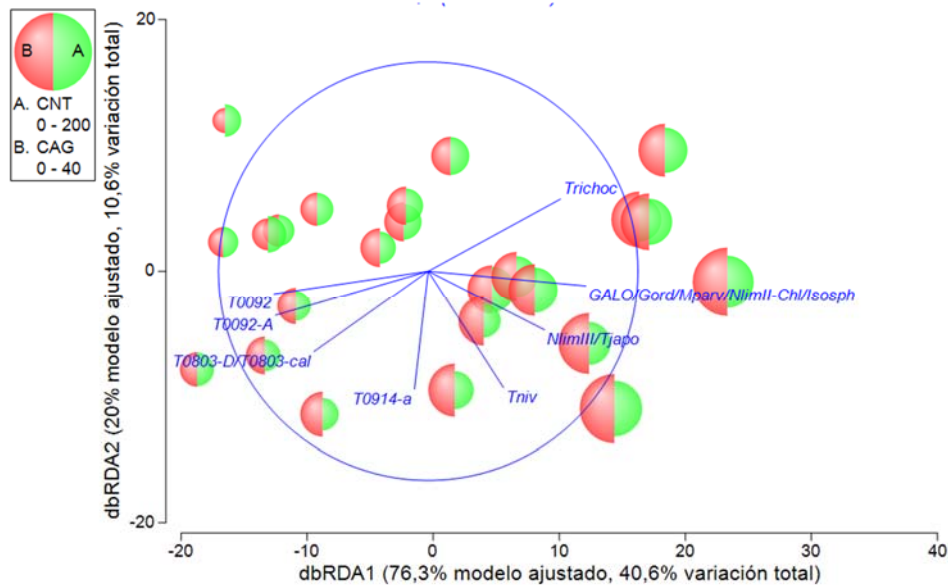


Figura 4.80. Gráfico de burbujas de la CNT y CAG en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables FQAF y bacterias filamentosas en QB. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,50 y -0,50.

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de variables FQAF de la EDAR CX indican una correlación positiva elevada de la CPT y CCarb con el dbRDA1, y positiva de la CAG con el dbRDA2 (tabla 4.75). Las bacterias filamentosas que más se relacionan ($r > 0,50$) en el dbRDA1 con valores de la CPT y CCarb superiores a 15 y 20 g/Kg SSVLM.d, respectivamente, son las siguientes: *M. parvicella*, tipo 0411, *N. limicola* III, CX-02, CX-03, *Trichococcus* sp., *N. limicola* II-Chl., *Ca. 'M. batavus'*, *Ca. 'M. parvicella'* (MPA645) y *Microthrix* (MPA1410) (figura 4.81). Contrariamente, tipo 0092, tipo 0581, tipo 0041, tipo 0092-A y tipo 0092-B lo hacen ($r > -0,50$) de forma inversa. Por otro lado, *Ca. 'M. parvicella'* (MPA60) y *Ca. 'M. calida'* parecen asociarse ($r > 0,50$) en el dbRDA2 con valores de la CAG superiores a 30 g/Kg SSVLM.d.

Tabla 4.75. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQAF y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dbRDA en la EDAR CX.

EDAR	Variables	dbRDA1	dbRDA2
CX	CPT	0,740	-0,340
	CCarb	0,680	0,291
	CAG	0,060	0,894
	Tipo 0411	0,78	-0,09
	Tipo 1701	-0,43	-0,13
	Tipo 021N*	-0,33	0,42
	<i>M. parvicella</i>	0,76	0,17
	Tipo 0581	-0,66	0,06
	Tipo 0041	-0,63	0,29
	Tipo 0092	-0,72	-0,03
	<i>N. limicola</i> III	0,59	-0,02
	<i>N. limicola</i> I	0,31	0,44
	<i>H. hydrossis</i>	-0,49	0,43
	CX-03	0,70	-0,29
	CX-02	0,72	-0,28
	<i>Trichococcus</i> sp.	0,45	0,41
	<i>Ca. 'A. europaea'</i>	-0,47	0,04
	<i>Ca. 'M. batavus'</i>	0,63	-0,10
	<i>N. limicola</i> II-Chl.	0,76	0,11
	T0803-cal	-0,47	0,31
	T0803-D	-0,44	0,40
	Tipo 0092-A	-0,68	-0,10
	Tipo 0092-B	-0,57	-0,12
	HHY	0,03	0,47
	MPA645	0,74	0,16
	<i>Ca. 'M. calida'</i>	-0,16	0,50
	MPA1410	0,63	0,14
	MPA60	0,17	0,66

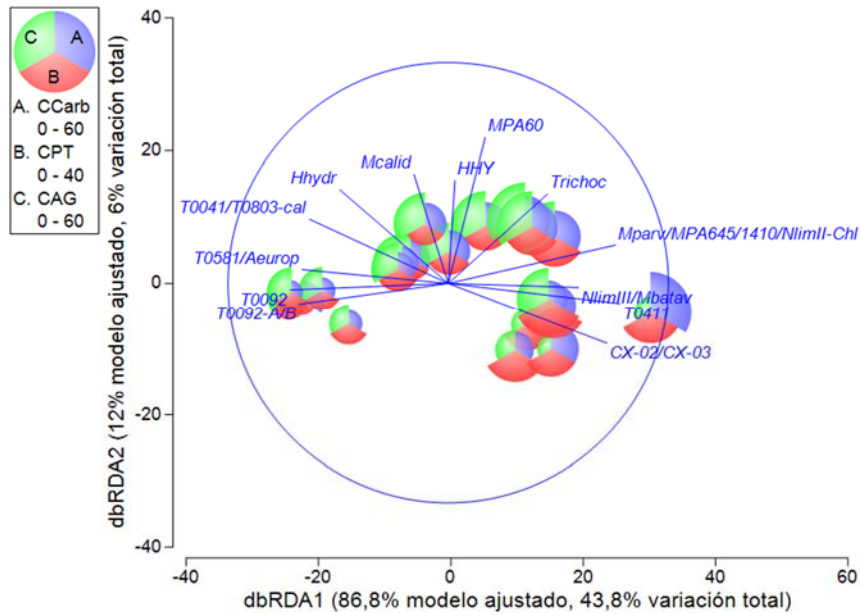


Figura 4.81. Gráfico de burbujas de la CPT, CAG y CCarb en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables FQAF y bacterias filamentosas en CX. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de -0,50 y 0,50.

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de variables FQAF del biorreactor CT1 indican una correlación positiva y negativa elevada de la CS^2 con el dbRDA1 y dbRDA2, respectivamente (tabla 4.76). Las bacterias filamentosas que más se relacionan ($r > -0,50$) en el dbRDA1 con valores de la CS^2 superiores a 4 g/Kg SSVLM.d son las siguientes: tipo 0803/0914 y *N. limicola* I. Contrariamente, GALO, *T. fructosivorans*, tipo 0803-D y *Gordonia* sp. parecen asociarse ($r > 0,50$) de forma inversa.

Tabla 4.76. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables FQAF y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dbRDA en el biorreactor CT1.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2
CT1	CS^2	-0,810	0,586
	DBO_5/NT	0,586	0,810
	Tipo 1701	-0,41	0,33
	GALO	0,58	-0,05
	Tipo 0803/0914	-0,56	-0,10
	Tipo 0041	-0,44	-0,14
	Tipo 0092	-0,46	-0,13
	<i>N. limicola</i> I	-0,76	0,03
	<i>H. hydrossis</i>	-0,47	-0,14
	<i>T. fructosivorans</i>	0,59	0,07
	Tipo 0803-D	0,61	0,20
	<i>Gordonia</i> sp.	0,62	0,15

Descripción de los modelos de interpretación ambiental basados en el análisis de correspondencias canónico

La longitud del gradiente de la matriz biológica determinada a través de la rutina DCA en los diferentes biorreactores ha permitido explorar la conveniencia de elegir un modelo unimodal o lineal para la interpretación ambiental de microorganismos filamentosos a partir del análisis de correspondencias canónico (CCA) (tabla 4.77). Los valores de la longitud del gradiente más elevados en el primer eje canónico han correspondido a los biorreactores CXCD (1,480 SD), CXAB (1,425 SD) y QB (1,345 SD), mientras que los más bajos lo han sido para CT2 (1,034 SD), CT1 (0,833 SD) y DN (0,822 SD). Todos los resultados indican que la longitud del gradiente no es adecuada para la exploración de los modelos a partir del CCA, puesto que los valores de los distintos biorreactores se encuentran por debajo de 1,5 SD, según ter Brack & Pretince (1988). En estos casos, el modelo lineal (RDA) se ajusta mejor a la naturaleza de los datos biológicos. Debido a que ya han sido exploradas las relaciones entre bacterias filamentosas y variables ambientales empleando modelos lineales basados en matrices distancia (DISTLM-dbrDA), no ha sido empleado el análisis de redundancia canónico (RDA) basado en análisis propios (*eigenanalysis*).

Tabla 4.77. Resultados de la rutina DCA a partir de la densidad de bacterias filamentosas.

Biorreactor	Ejes	1	2	3	4	Inercia total
QB	Valores propios	0,172	0,045	0,019	0,013	0,531
	Longitud del gradiente	1,345	0,847	0,806	0,620	
	% varianza acumulada por las v. biológicas	32,4	40,7	44,3	46,7	
CXAB	Valores propios	0,248	0,052	0,028	0,010	0,569
	Longitud del gradiente	1,425	0,924	0,811	0,578	
	% varianza acumulada por las v. biológicas	43,5	52,6	57,6	59,4	
CXCD	Valores propios	0,276	0,050	0,018	0,010	0,604
	Longitud del gradiente	1,480	0,921	0,576	0,730	
	% varianza acumulada por las v. biológicas	45,6	54,0	56,9	58,5	
CT1	Valores propios	0,056	0,022	0,016	0,008	0,213
	Longitud del gradiente	0,883	0,669	0,0677	0,583	
	% varianza acumulada por las v. biológicas	26,2	36,7	44,2	48,1	
CT2	Valores propios	0,070	0,035	0,012	0,008	0,258
	Longitud del gradiente	1,034	0,707	0,544	0,647	
	% varianza acumulada por las v. biológicas	27,2	40,6	45,4	48,4	
DN	Valores propios	0,056	0,019	0,011	0,005	0,230
	Longitud del gradiente	0,822	0,561	0,406	0,410	
	% varianza acumulada por las v. biológicas	24,4	32,6	37,5	39,6	

4.6 Relación entre la comunidad de bacterias filamentosas y los componentes del nitrógeno

Se ha utilizado la rutina DISTLM para explorar las relaciones entre la comunidad de bacterias filamentosas y distintos aceptores de electrones en la asimilación del sustrato, así como su relación con el proceso de nitrificación-desnitrificación, utilizando para ello los componentes del nitrógeno del efluente explorados en el apartado 4.2. Los resultados encontrados en el test secuencial de los modelos de los diferentes biorreactores indican que el N-NO_2^- y $\% \text{N-NO}_2^-$ explican el mayor porcentaje de variabilidad de la abundancia de bacterias filamentosas de las EDAR y CX, respectivamente, siendo especialmente elevado en el caso de esta última EDAR (42,5%) (tabla 4.77). Por otro lado, el N-NO_3^- parece contribuir con el mayor porcentaje de variación en el caso de la matriz total, mientras que el rNKTs lo hace para explicar la variabilidad de las bacterias *Nostocoida limicola* en la matriz denominada como Nost*, correspondiente a los biorreactores QB, CXAB, CXCD y DN. En los biorreactores DN y CT (CT1+CT2) no ha sido posible obtener modelos de interpretación ambiental debido al bajo nivel de significación encontrado respecto a los distintos componentes del nitrógeno, siendo tan solo significativo el N-NO_3^- en la EDAR DN y el NTs en CT. Por último, destacar que los mayores porcentajes de variación explicada de la comunidad de bacterias filamentosas han correspondido a los modelos de CX y matriz total, siendo moderado-bajos en el caso de QB y matriz Nost* (tabla 4.78).

Tabla 4.78. Test secuencial, procedimientos y criterios empleados en la rutina DISTLM de los componentes del nitrógeno y en cada uno de los biorreactores y la matriz total, a partir de la abundancia de bacterias filamentosas.

Variable	QB	CX	DN	CT	Nost*	Matriz total
NTs		5,1		13,5		4,9
rNTs		3,9			5,4	3,2
N-NH_4^+		6,0			5,9	11,5
r N-NH_4^+	4,7					
N-NO_2^-	19,4					
N-NO_3^-			11,0			23,8
rNKTs					12,1	2,9
$\% \text{N-NO}_2^-$		42,5				
Proced.	<i>forw.</i>	<i>step.</i>	<i>forw.</i>	<i>forw.</i>	<i>step.</i>	<i>step.</i>
Criterio	<i>adj. R²</i>	BIC	<i>adj. R²</i>	<i>adj. R²</i>	BIC	BIC
% Var. total	19,4	57,6	11,0	13,5	23,4	46,4

(*) matriz de bacterias *N. limicola* de QB, CX y DN

Tabla 4.79. Porcentaje de variación explicada de la abundancia de bacterias filamentosas por los ejes individuales en la rutina DISTLM, a partir de los componentes del nitrógeno de los distintos biorreactores y la matriz total.

	Eje	Variación explicada del modelo ajustado		Variación explicada del total de la variación	
		Individual	Acumulada	Individual	Acumulada
QB	1	83,98	83,98	20,22	20,22
	2	16,02	100	3,86	24,07
CX	1	85,79	85,79	49,39	49,39
	2	7,94	93,73	4,57	53,96
	3	3,43	97,16	1,97	55,93
	4	2,84	100	1,64	57,56
Nost*	1	51,88	51,88	12,13	12,13
	2	36,77	88,65	8,6	20,72
	3	11,35	100	2,65	23,38
Total	1	56,64	56,64	26,25	26,25
	2	25,16	81,8	11,66	37,91
	3	11,02	92,82	5,11	43,02
	4	6,16	98,97	2,85	45,88
	5	1,03	100	0,48	46,35

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de componentes del nitrógeno de QB indican una correlación positiva elevada del $N-NO_2^-$ con el dbRDA1 y negativa elevada del $rN-NH_4^+$ con el dbRDA2 (tabla 4.79). Las bacterias filamentosas que más se relacionan ($r > 0,45$) con valores altos del $N-NO_2^-$ son las siguientes: GALO, *N. limicola* III, *N. limicola* II *Chl.*, *Isosphaera* sp. y *Gordonia* sp. El diagrama de burbujas de la figura del dbRDA indica que la abundancia de dichos organismos se encuentra influenciada por valores del $N-NO_2^-$ en el efluente superiores a 1 mg/L (figura 4.82). Contrariamente, tipo 0803/0914, tipo 0092 y tipo 0092-A parecen encontrarse relacionados ($r > -0,45$) de forma inversa. Por último, el tipo 0914-a y *Nostocoida limicola* I se relacionan ($r > 0,45$) en el dbRDA2 con valores bajos del $rN-NH_4^+$.

Tabla 4.80. Coeficientes de correlación múltiple parcial de los componentes del nitrógeno y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dbRDA en QB.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2
QB	$N-NO_2^-$	0,923	-0,385
	$rN-NH_4^+$	-0,385	-0,923
	<i>M. parvicella</i>	0,41	-0,11
	<i>M. parvicella</i> *	-0,40	-0,08
	GALO	0,46	-0,04
	Tipo 0803/0914	-0,51	-0,09
	Tipo 0041	-0,40	-0,34
	Tipo 0092	-0,46	0,22
	<i>N. limicola</i> III	0,48	-0,11
	<i>N. limicola</i> I	0,03	0,46
	<i>N. limicola</i> II <i>Chl</i>	0,57	0,05
	<i>Isosphaera</i> sp.	0,65	-0,01
	Tipo 0803-D	-0,40	0,24
	Tipo 0092-A	-0,70	-0,03
	Tipo 0914-a	0,06	0,64
	<i>Gordonia</i> sp.	0,49	-0,06

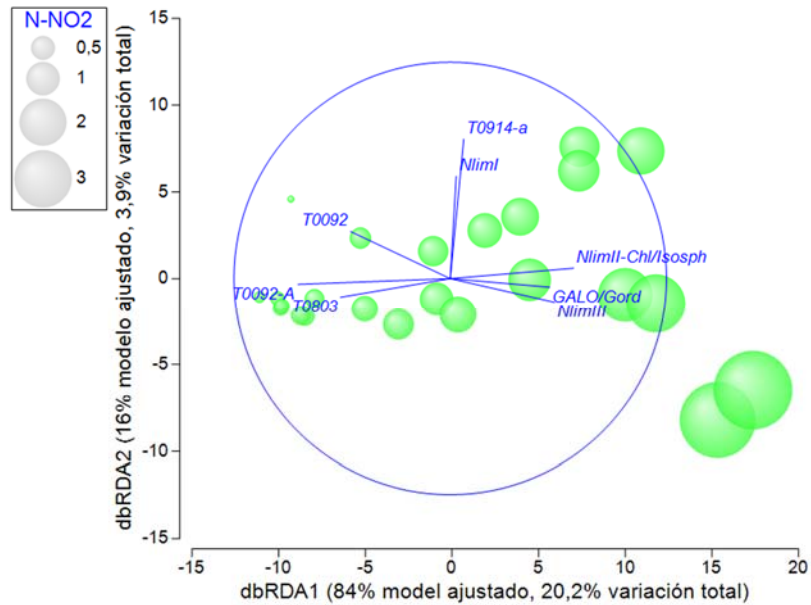


Figura 4.82. Gráfico de burbujas del N-NO₂⁻ en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre los componentes del nitrógeno y bacterias filamentosas en QB. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,45 y -0,45.

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de componentes del nitrógeno de CX indican una correlación positiva elevada del %N-NO₂⁻ y N-NH₄⁺ con el dbRDA1, y negativa del NTs y rNTs con el dbRDA2 (tabla 4.80). Las bacterias filamentosas que más se relacionan ($r > 0,50$) con valores elevados del %N-NO₂⁻ y N-NH₄⁺ son las siguientes: tipo 0411, *M. parvicella*, *N. limicola* III, CX-03, CX-02, *Ca.* 'M. batavus', *N. limicola* II *Cbl.*, *Ca.* 'M. pavicella' (MPA645) y *Microthrix* (MPA1410). El diagrama de burbujas representado en la figura del dbRDA indica que la abundancia de dichas bacterias se encuentra influenciada por valores del %N-NO₂⁻ superiores al 7%, aproximadamente (figura 4.83). De forma contraria, las bacterias tipo 0581, tipo 0041, tipo 0092, *H. hydrossis*, *Ca.* 'A. europaea', tipo 0803-cal, tipo 0092-A y tipo 0092-B parecen encontrarse asociadas ($r > -0,50$) con valores inferiores del %N-NO₂⁻. Por otro lado, tipo 0803-I se relaciona ($r = -0,54$) en el dbRDA2 con valores del NTs y rNTs elevados, mientras que *T. eikelboomii* lo hace ($r = 0,50$) con valores bajos.

Tabla 4.81. Coeficientes de correlación múltiple parcial de los componentes del nitrógeno y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dbRDA en CX.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2
CX	%N-NO ₂ ⁻	0,700	0,206
	N-NH ₄ ⁺	0,689	0,078
	NTs	0,176	-0,692
	rNTs	0,110	-0,688
	Tipo 0411	0,71	-0,03
	Tipo 021N*	-0,45	0,03
	<i>M. parvicella</i>	0,77	-0,02
	Tipo 0581	-0,76	-0,02
	Tipo 0041	-0,78	-0,10
	Tipo 0092	-0,77	-0,04
	<i>N. limicola</i> III	0,62	-0,26
	<i>H. hydrossis</i>	-0,62	0,11
	CX-03	0,77	-0,09
	CX-02	0,82	0,07
	<i>Ca. 'A. europaea'</i>	-0,54	-0,19
	<i>Ca. 'M. batavus'</i>	0,72	-0,08
	<i>N. limicola</i> II Chl.	0,78	-0,04
	<i>T. eikelboomii</i>	0,05	0,50
	Tipo 0803-cal	-0,55	0,10
	Tipo 0803-I	-0,13	-0,54
Tipo 0803-D	-0,45	-0,04	
Tipo 0092-A	-0,77	-0,18	
Tipo 0092-B	-0,63	-0,31	
MPA645	0,68	-0,05	
MPA1410	0,67	0,04	

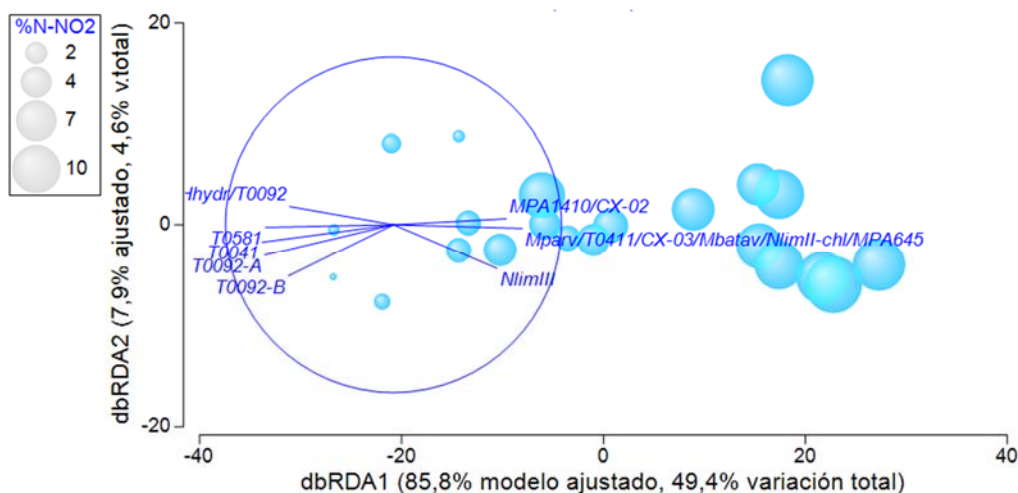


Figura 4.83. Gráfico de burbujas del %N-NO₂⁻ en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre los componentes del nitrógeno y bacterias filamentosas en CX. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,50 y -0,50.

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de componentes del nitrógeno de CX+QB+DN para bacterias filamentosas *N. limicola* (matriz Nost*) indican una elevada correlación negativa del

rNKTs con el dbRDA1, negativa del N-NH₄⁺ y rNTs con el dbRDA2 y dbRDA3, respectivamente (tabla 4.81). La bacteria filamentosa *N. limicola* que más se relaciona ($r=-0,46$) con valores elevados del rNKTs es *Ca.* 'A. europaea'. El diagrama de burbujas expresado en la figura del dbRDA indica que la abundancia de dicha bacteria se encuentra influenciada por valores del rNKTs superiores al 60%, aproximadamente (figura 4.84). De forma contraria, la bacteria *N. limicola* II-Chl parece encontrarse asociada ($r=0,60$) con valores del rNKTs inferiores. Por otro lado, *Isosphaera* sp. y *N. limicola* III se relacionan ($r=-0,45$ y $-0,61$, respectivamente) en el dbRDA2 con valores del N-NH₄⁺ del efluente superiores a 10 mg/L, mientras que *Ca.* 'M. batavus' lo hace ($r=-0,40$) en el dbRDA3 con elevado rNTs.

Tabla 4.82. Coeficientes de correlación múltiple parcial de los componentes del nitrógeno y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas *N. limicola* con los ejes del dbRDA.

Biorreactor	Variables	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3
QB+CX+DN	rNKTs	-0,872	-0,132	0,471
	N-NH ₄ ⁺	0,403	-0,740	0,539
	rNTs	-0,277	-0,560	-0,700
	<i>N. limicola</i> III	0,07	-0,61	0,10
	<i>N. limicola</i> I	0,24	0,24	0,10
	<i>Ca.</i> 'A. europaea'	-0,46	-0,29	0,11
	<i>Ca.</i> 'M. batavus'	0,22	-0,12	-0,40
	<i>N. limicola</i> II-Chl.	0,60	-0,18	0,12
	<i>Trichococcus</i> sp.	0,13	-0,16	0,12
	<i>T. japonica</i>	0,14	-0,20	0,13
	<i>Isosphaera</i> sp.	-0,17	-0,45	0,30

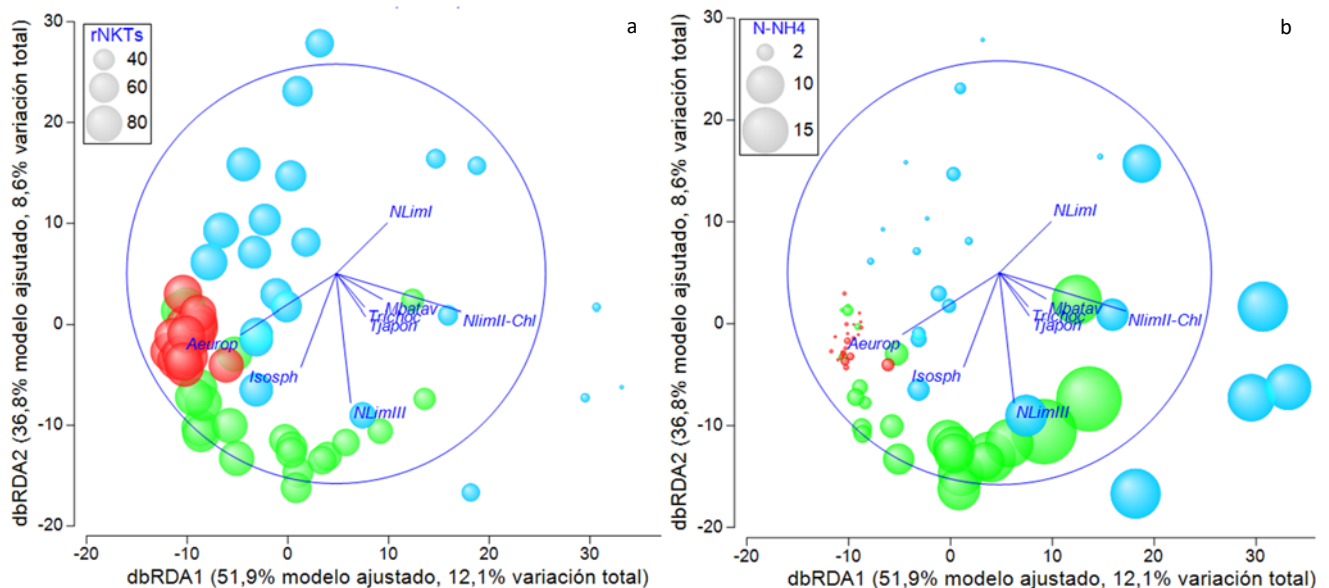


Figura 4.84. Gráfico de burbujas del rNKTs y el N-NH₄ en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre los componentes del nitrógeno y bacterias filamentosas *Nostocoida limicola*. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson de las distintas bacterias.

Los coeficientes de correlación múltiple parcial correspondientes al modelo de componentes del nitrógeno a partir de la matriz total indican una correlación positiva elevada del N-NO₃⁻, NTs y rNKTs con el dbRDA1, dbRDA3 y dbRDA4, respectivamente, mientras que el N-NH₄⁺ lo hace de forma negativa con el dbRDA2 (tabla 4.82). Las bacterias filamentosas que más se relacionan ($r > -0,45$) con valores bajos del N-NO₃⁻ en el dbRDA1 son: tipo 0914-a, tipo 0803-cal, tipo 0803-D, tipo 0803-I, tipo 0092-A y tipo 0092. El diagrama de burbujas de la figura del dbRDA indica que la abundancia de dichas bacterias se encuentra influenciada por valores del N-NO₃⁻ inferiores a 5 mg/L (figura 4.85). De forma contraria, el tipo 0411 se asocia ($r = 0,45$) con valores del N-NO₃⁻ superiores, coincidiendo con valores de N-NH₄⁺ superiores a 10 mg/L en el dbRDA2. Por otro lado, GALO y tipo 1851 se relacionan ($r > -0,45$) en el dbRDA1 con valores de N-NO₃⁻ inferiores, coincidiendo en el dbRDA2 con valores elevados de N-NH₄⁺. Por último, tipo 0092-B, *H. hydrossis*, tipo 0041 y tipo 0581 se relacionan con bajos valores de N-NH₄⁺, coincidiendo en el dbRDA3 con valores elevados de NTs en el caso de este último morfotipo (figura 4.86).

Tabla 4.83. Coeficientes de correlación múltiple parcial de los componentes del nitrógeno y correlaciones de Pearson de bacterias filamentosas con los ejes del dbRDA en la matriz total.

Biorreactor	VARIABLES	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3	dbRDA4
Matriz total	N-NO₃⁻	0,965	-0,038	0,015	0,0258
	N-NH₄⁺	-0,130	-0,800	-0,453	0,393
	NTs	0,009	-0,483	0,700	-0,111
	rNKTs	-0,161	0,378	-0,056	0,700
	rNTs	0,160	-0,003	-0,555	-0,527
Tipo 0411		0,45	-0,40	0,01	-0,27
Tipo 0581		0,31	0,41	0,52	-0,08
GALO		-0,64	-0,50	0,07	0,15
Tipo 0041		-0,23	0,50	0,12	0,11
Tipo 0092		-0,63	0,34	0,12	-0,06
<i>H. hydrossis</i>		0,15	0,48	-0,03	0,08
Tipo 1851		-0,71	-0,47	0,23	0,06
Tipo 0803-cal		-0,56	0,25	-0,01	0,03
Tipo 0803-I		-0,51	-0,04	-0,20	-0,15
Tipo 0803-D		-0,58	0,15	-0,01	0,21
Tipo 0092-A		-0,73	0,23	0,04	-0,05
Tipo 0092-B		0,01	0,64	-0,19	-0,25
Tipo 0914-a		-0,46	-0,06	-0,10	0,06

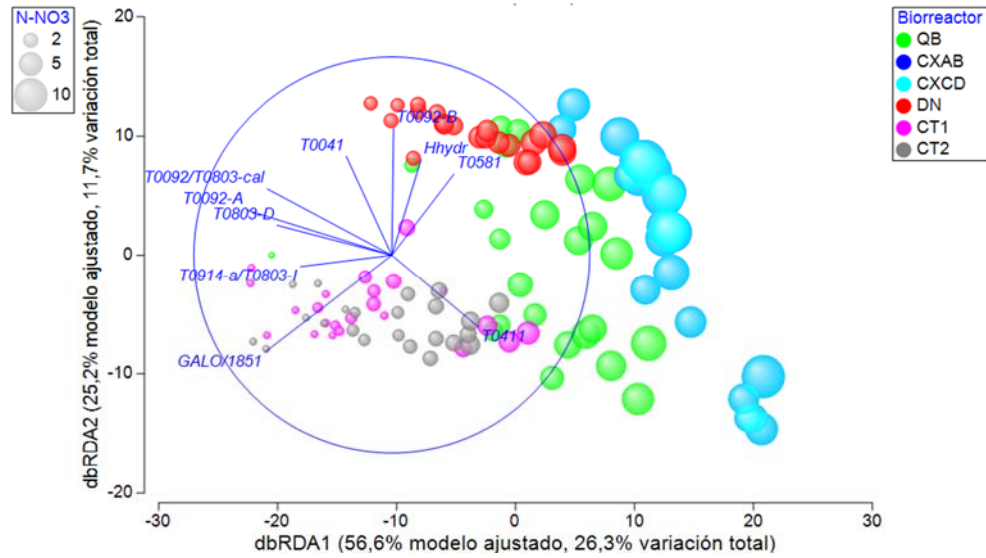


Figura 4.85. Gráfico de burbujas del N-NO_3^- en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre los componentes del nitrógeno y bacterias filamentosas a partir de la matriz total. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,40 y -0,40.

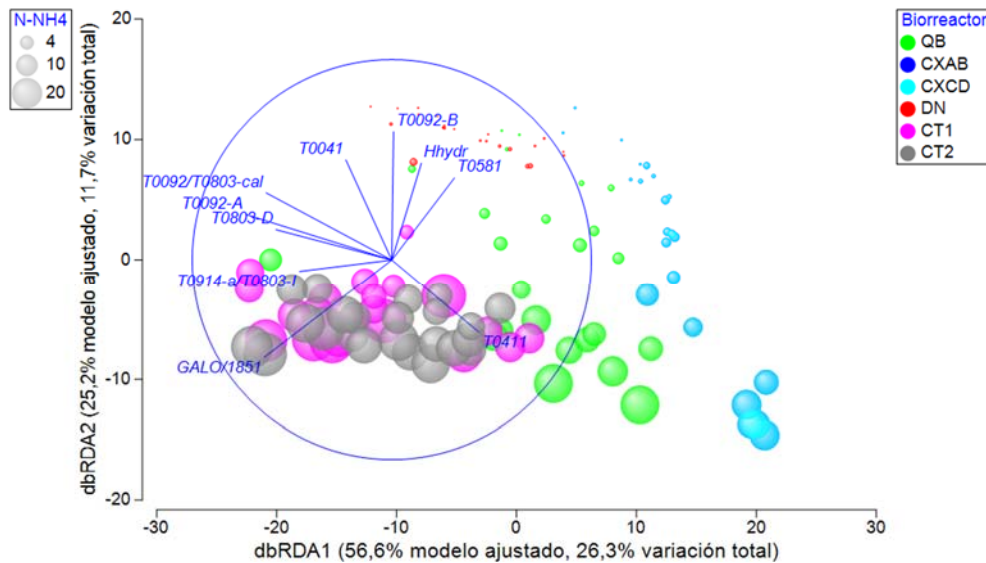


Figura 4.86. Gráfico de burbujas del N-NH_4^+ en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre los componentes del nitrógeno y bacterias filamentosas a partir de la matriz total. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,40 y -0,40.

DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

Uno de los objetivos fundamentales en este trabajo es dilucidar las relaciones significativas entre las variables biológicas y fisicoquímicas y operacionales que permitan la interpretación ecológica en los reactores biológicos de las plantas depuradoras. La exploración se ha realizado a través de diversos análisis multivariantes, empleando técnicas paramétricas y no paramétricas de ordenación basadas en matrices distancia biológicas (distancia de Bray-Curtis) y ambientales (distancia euclídea) (Clarke *et al.*, 2014). Las rutinas no paramétricas han sido muy utilizadas en estudios de ecología del medio marino, despertando el interés en otros campos de la ecología microbiana. Son escasos los trabajos publicados sobre exploración temporal y espacial de protistas, metazoos y bacterias filamentosas basados en rutinas estadísticas como las utilizadas en el presente trabajo (Hu *et al.*, 2012, 2013a; Leal *et al.*, 2013; Jaromin-Glen *et al.*, 2013; Papadimitriou *et al.*, 2013). Por ello, en la discusión se expondrá el potencial de dichas herramientas numéricas, destacando su utilidad en la búsqueda de nuevos modelos para la propuesta de organismos bioindicadores en el control del proceso de fangos activos.

El estudio de la relaciones entre componentes bióticos y abióticos de cualquier tipo de ecosistema, natural o artificial, pasa inevitablemente por la difícil elección del modelo adecuado (Gioria *et al.*, 2010). En el presente trabajo, la búsqueda de organismos bioindicadores a través de su interpretación ecológica ha sido posible gracias al empleo de un doble enfoque: exploración de modelos de regresión lineal múltiple multivariante a partir de rutinas no paramétricas y semiparamétricas (Anderson *et al.*, 2008; Clarke *et al.*, 2014; Clarke & Gorley, 2015) y técnicas de ordenación canónica, basadas en el análisis directo del gradiente (ter Brack & Pretince, 1988; Šmilauer & Lepš, 2014). Los primeros métodos son especialmente flexibles, robustos y apropiados para el análisis de datos de comunidades biológicas, no siendo necesario la condición de normalidad (Clarke, 1993). El uso paralelo de ambos modelos ha permitido en algunos casos complementar y en otros corroborar las relaciones previamente establecidas.

La búsqueda de bioindicadores de forma directa e indirecta, tanto de las variables operacionales como de los rendimientos del proceso en fangos activos, ha sido motivo de estudio por numerosos investigadores desde la década de los noventa en el siglo pasado. La mayoría de los organismos bioindicadores han sido propuestos en base a los resultados obtenidos a partir del análisis de componentes principales (PCA) y/o análisis bivariado, principalmente a través del cálculo de los coeficientes de correlación de Pearson y/o Spearman. Parte de la discusión se ha centrado en el alcance y limitaciones de ambas técnicas; que en el caso del PCA, no se adapta bien a la naturaleza de los datos biológicos, en el que predominan valores cero, siendo especialmente indicada para la exploración de variables ambientales (Ramette, 2007; Clarke *et al.*, 2014). En el caso del análisis bivariado, la relación encontrada no implica causalidad, y por lo tanto, no implica necesariamente que exista una relación directa significativa, permitiendo tan solo establecer asociaciones generales.

5.1 Dinámica poblacional de protistas y metazoos en respuesta al factor biorreactor y estacional

La agrupación de los ciliados en grupos funcionales ha sido extensamente utilizada y relacionada con variables operacionales y fisicoquímicas en las EDAR (Madoni, 1986, 1988, 1994; Martín-Cereceda, 1996; Zhou *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2013b; Santos *et al.*, 2014). Por otro lado, el SBI (*Sludge Biotic Index*) para el conocimiento de la calidad biológica del fango (Madoni, 1994b), se basa en los valores de abundancia de diferentes grupos funcionales y algunos géneros y especies de protistas. Este índice ha sido cuestionado en algunos trabajos (Arévalo *et al.*, 2009; Drzewicki *et al.*, 2011; Leal *et al.*, 2013), en los que se plantea que el uso exclusivo del mismo para monitorizar el proceso biológico puede dar lugar a valoraciones poco consistentes, debido a que diferentes especies o géneros de protistas pertenecientes a un mismo grupo funcional pueden encontrarse influenciados por distintos valores de las variables ambientales. El estudio de la dinámica poblacional de grupos taxonómicos y su relación con rendimientos de planta a escala real ha sido escasamente documentado (Pérez-Uz *et al.*, 2007; Serrano *et al.*, 2008b, 2009, 2010). En cambio, ciertos grupos de protistas y metazoos han sido ampliamente estudiados y relacionados con variables de las plantas, como por ejemplo: pequeños flagelados (Salvadó & Gracia, 1993; Madoni, 1994b; Arévalo *et al.*, 2009; Pérez-Uz *et al.*, 2010; Drzewicki *et al.*, 2011; Canals *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2014), grandes flagelados (Zhou *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2013b), amebas (Liu *et al.*, 2008), amebas testáceas (Salvadó & Gracia 1993; Madoni, 1994b; Zhou *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2013b), amebas desnudas (Salvadó & Gracia 1993; Pérez-Uz *et al.*, 2010), metazoos (Hu *et al.*, 2013b), rotíferos (Salvadó & Gracia 1993; Chen *et al.*, 2004; Puigagut *et al.*, 2007; Fialkowska *et al.*, 2008).

Las variables biológicas que aparecen con mayor frecuencia y densidad absoluta en los 6 biorreactores estudiados coinciden con las encontradas por algunos autores: *Aspidisca cicada* (Drakides, 1978; Curds, 1982; Poole, 1984; Madoni, 1991; Salvadó & Gracia 1993; Martín-Cereceda *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2004; Nicolaou *et al.*, 2005; Dubber & Gray, 2011a; Lee *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2013b; Santos *et al.*, 2014), *Vorticella aquadulcis* (Madoni, 1988; Martín-Cereceda *et al.*, 1996; Pérez-Uz *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2013a), *Acineria uncinata* (Curds & Cockburn, 1970b; Klimowicz, 1970, 1973, 1974; Schofield *et al.*, 1971; Morishita, 1976; Drakides, 1978; Sladka & Sladeck, 1985; Vedry, 1987; Madoni, 1988; Toman & Rejic, 1988; Duchene, 1991; Salviati *et al.*, 1991; Cech *et al.*, 1993; Madoni, 1994b; Becarés, 1994; Nicolau *et al.*, 2005; Puigagut *et al.*, 2009; Drzewicki *et al.*, 2011; Dubber & Gray, 2011b), amebas grandes (Pérez-Uz *et al.*, 2010), amebas pequeñas (Salvadó & Gracia, 1993; Pérez-Uz *et al.*, 2010) y *Arvella vulgaris* (solo referencias de *Arvella* sp.), *Epistylis balatonica* (Pérez-Uz *et al.*, 2010) y *Trochilia minuta* (Salvadó & Gracia, 1993; Madoni *et al.*, 1996; Dubber & Gray, 2011a).

El escalamiento multidimensional no métrico (nMDS), análisis clúster y análisis de similitudes (ANOSIM) cruzado, empleados para relacionar los factores biorreactor y estaciones del año con las variables biológicas, han revelado

que existe un patrón definido de la distribución de protistas y metazoos y sus grupos en función del factor biorreactor (factor espacial) y a lo largo de las estaciones (factor temporal). La mayor distancia en el nMDS y las mayores diferencias encontradas entre los biorreactores ha sido las correspondientes a QB y CT1. Estas diferencias son debidas principalmente a la mayor abundancia de ciliados hipotricos y peritricos en CT1 y QB, respectivamente, pudiendo ser atribuido al mayor tiempo de retención hidráulico en el reactor (TRHr) de operación en QB. Algunos autores han encontrado, a partir del análisis bivariado y PCA, una relación directa entre los ciliados peritricos y el TRHr en una planta con dos configuraciones diferentes (Hu *et al.*, 2013b). Por otro lado, los valores elevados del estadístico R de la rutina ANOSIM entre DN y el resto de biorreactores, así como la agrupación de sus muestreos en el nMDS, indican una elevada estabilidad y una escasa variación en la comunidad biológica, probablemente debido a las condiciones particulares de operación observadas en dicho biorreactor, como por ejemplo: valores bajos de la carga másica (CM) y elevados de la edad del fango (EF), coincidiendo con elevados valores del TRHr, lo cual concuerda con los resultados de los gráficos de cajas y bigotes en DN. Otro resultado de interés, es el distinto comportamiento observado en las EDAR con líneas de tratamiento diferenciadas, como son las pertenecientes a CX y CT. En el caso de los biorreactores de CX (CXAB y CXCX) no se observa un patrón definido de distribución de las variables biológicas, probablemente debido a que los valores de las variables operacionales durante el periodo de estudio fueron muy similares en ambas líneas. Además, las características fisicoquímicas del afluente son también uniformes en ambas, diferenciándose tan solo en el porcentaje del caudal afluente tratado, siendo del 40% para la línea CXAB y del 60% para la línea CXCD. Por el contrario, en los biorreactores de la EDAR CT (CT1 y CT2) se observan diferencias significativas en la distribución de sus comunidades de protistas y metazoos, debido en gran parte a los valores más elevados de la EF en el caso del biorreactor CT2, y probablemente también a las diferentes características fisicoquímicas en ambas líneas. En apartados posteriores se discuten las variables ambientales que han explicado dichas diferencias.

El factor estacional parece presentar una menor influencia que el espacial (biorreactor) en la dinámica poblacional de la comunidad biológica, según los resultados obtenidos a partir del nMDS y ANOSIM de 1 vía. En cambio, el análisis multivariante permutacional de la varianza (PERMANOVA) de 1 vía ha revelado la existencia de diferencias significativas entre estaciones a partir de protistas y metazoos y sus grupos, identificando a partir del análisis canónico de coordenadas principales (CAP) aquellos organismos que mejor discriminan los grupos de muestras respecto al factor estacional. La agrupación de la mayoría de muestras referentes a verano-otoño e invierno-primavera parecen responder principalmente a la variable temperatura en el reactor (T^a_r), relación directa que ha sido observada en el CAP de variables ambientales según el factor estacional. El clima mediterráneo se caracteriza por veranos muy calurosos y otoños templados, mientras que el invierno y parte de la primavera suelen ser más fríos. De esta forma y teniendo en cuenta la inercia térmica del agua, la agrupación de muestras verano-otoño se ha correspondido con elevados valores de la T^a_r , principalmente por encima de 22-25 °C. El mayor número y densidad

absoluta de protistas, metazoos y sus grupos se ha relacionado con los meses más calurosos, lo que corrobora los resultados encontrados por Sudo & Aiba (1971) y Shen *et al.* (1990), que indican que la temperatura óptima de crecimiento de la mayoría de ciliados se encuentra entre 25 y 30 °C. Además, la mayor densidad de rotíferos, metazoos, grandes flagelados, amebas desnudas y amebas testáceas parecen relacionarse con las estaciones más calurosas. Dichas observaciones estarían de acuerdo con las señaladas por otros autores, que relacionan positivamente la T^ar con los grupos de metazoos, amebas desnudas, grandes flagelados (Hu *et al.*, 2013b) y amebas testáceas (Madoni, 1994b, Hu *et al.*, 2013b). Por otro lado, algunos protistas como *A. vulgaris*, *O. articulata*, *A. tuberosa*, *P. trichophorum*, *E. sulcatum*, *Lecane* sp., *E. plicatilis* y amebas desnudas grandes incrementan su presencia y abundancia en las estaciones más calurosas. En el caso de *E. sulcatum* y amebas desnudas grandes (*Mayorella* sp.), los resultados coinciden con los propuestos por Hu *et al.* (2013b), mientras que en el caso de *E. Plicatilis*, estarían en desacuerdo con los encontrados por los mismos autores. Dichas discrepancias podrían deberse al escaso número de réplicas (tres de 25 µL) utilizadas por Hu *et al.* (2013b) en el recuento de ciliados sésiles coloniales, teniendo en cuenta que algunos autores han demostrado que seis réplicas de 25 µL son las más adecuadas para una recuperación de especies del 90-95% (Dubber *et al.*, 2009).

La rutina de porcentajes de similitudes (SIMPER) cruzada con ambos factores (biorreactor-estacional) ha permitido identificar las variables biológicas que más han contribuido a las diferencias entre los biorreactores a lo largo de las estaciones, siendo estas las siguientes: *E. plicatilis*, amebas desnudas grandes, *E. balatonica*, *Lecane* sp., *T. minuta*, *E. sulcatum*, *A. uncinata*, *P. trichophorum* y *A. vulgaris*.

5.2 Protistas y metazoos bioindicadores del proceso de eliminación del nitrógeno

Hamm (1964) fue, probablemente, el primer autor que asoció la nitrificación en fangos activos con la presencia de determinados protistas, observando un aumento de la densidad de *Aspidisca* sp. cuando aumentaba la eficacia en la nitrificación. En un trabajo exhaustivo en 13 EDAR, Poole (1984) llevó a cabo el primer estudio comparativo de la comunidad de protistas y metazoos entre plantas con presencia y ausencia de nitrificación, determinando el valor indicador de algunas especies y géneros de protistas y metazoos respecto al proceso de nitrificación. Posteriormente, Madoni *et al.* (1993) asociaron la nitrificación con algunas variables del proceso y fisicoquímicas del afluente, licor mezcla y protistas a partir de un análisis factorial, concluyendo que la elevada concentración de los sólidos suspendidos del licor mezcla (SSLM), oxígeno disuelto (OD), TRHr y baja CM favorecen el rendimiento del proceso de nitrificación. Estudios posteriores han corroborado estos resultados y explorado otras variables que favorecen dicho proceso, como son: el bajo %DQOs (soluble) y DQOs/NKTs (Zornoza *et al.*, 2011, 2012b). Por otro lado, son numerosos los autores que han relacionado directamente estas variables con la abundancia de protistas (Klimowicz, 1970, 1974; Drakides, 1978; Poole, 1984; Sladka & Sladeck, 1985; Esteban *et al.*, 1991; Madoni *et al.*,

1993; Salvadó & Gracia, 1993; Madoni, 1988, 1994b; Martín-Cereceda *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2004; Dubber & Gray, 2011a; Hu *et al.*, 2012; Zornoza *et al.*, 2012a; Santos *et al.*, 2014).

Los rendimientos de eliminación del nitrógeno se encuentran directamente condicionados por las variables operacionales y fisicoquímicas de las EDAR (variables explicativas). De la misma forma, la dinámica poblacional de los microorganismos se encuentra influenciada por dichas variables de control del proceso. Si tenemos en cuenta simultáneamente ambos pares de relaciones, así los protistas y metazoos (como variables respuesta) podrían ser buenos bioindicadores del rendimiento del proceso de eliminación del nitrógeno, si ambos conjuntos de variables se encuentran condicionadas por valores similares de las variables operacionales y fisicoquímicas de la EDAR. Este valor bioindicador ha motivado numerosos estudios explorando la relación entre protistas y componentes del nitrógeno (Madoni *et al.*, 1993; Madoni, 1994b; Martín-Cereceda *et al.*, 1996; Papadimitriou *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2008; Pérez-Uz *et al.*, 2007, 2009, 2010; Serrano *et al.*, 2008b; Dubber & Gray, 2011a; Hu *et al.*, 2013b; Jaromin-Glen *et al.*, 2013). En la mayoría de estos estudios se observa generalmente el empleo de un número reducido de criterios para la selección de los componentes del nitrógeno que mejor explican las variables biológicas, empleando en general entre 1 y 3 componentes. Por otro lado, hasta el momento son escasos los trabajos realizados empleando rutinas estadísticas multivariantes para determinar los componentes del nitrógeno más significativos y que mejor explican la respuesta de las variables biológicas (Jaromin-Glen *et al.*, 2013).

El término “habilidad en la nitrificación”, empleado a partir de los valores del N-NH₃, N-NO₂ y N-NO₃ (Madoni *et al.*, 1993) en una escala categórica (1=nitrificación y 0=no nitrificación), no indica los criterios de agrupación de valores. Así mismo, Madoni en su propuesta del índice biótico de fango (SBI) tampoco indica el procedimiento para el cálculo de la variable “nitrificación” (Madoni, 1994b). Martín-Cereceda *et al.* (1996) emplean el N-NH₃ del efluente, mientras que Papadimitriou *et al.* (2004) utilizan la concentración del N-NO₃⁻ del efluente para determinar la capacidad de nitrificación. El empleo de esta última variable se presenta confusa y podría ser poco acertada si las muestras corresponden a EDAR que dispongan de selectores anóxicos y/o realicen ciclos temporales de anoxia, lo cual no se indica en dicho trabajo. Los valores del N-NO₃⁻ del efluente no pueden ser empleados para determinar la capacidad de nitrificación en EDAR con selección temporal o espacial anóxica, debido a que dichos valores dependen del metabolismo de las bacterias desnitrificantes. Zhou *et al.* (2006) relacionan la microbiota del fango activo con la concentración del nitrógeno total (NT) del efluente, mientras que Zhou *et al.* (2008) lo hacen con el NT y N-NH₃. El componente NT incluye el nitrógeno particulado de los SSLM que se pueden escapar con el efluente durante episodios de mala separación del fango activo, lo cual no tiene relación directa con el proceso biológico de eliminación del nitrógeno. Algunos autores indican que el contenido del nitrógeno total del licor mezcla puede encontrarse dentro del rango de 41-108 mg N/g SSVLM (Zornoza *et al.*, 2012a), por lo tanto, ante episodios de mala separación en el clarificador secundario (p.ej. *bulking* o *foaming* filamentoso) con abundante pérdida de SSLM,

la variable NT dejaría de ser representativa respecto al rendimiento del proceso de nitrificación. Además, el NT del efluente incluye el N-NO_3^- , que como se ha indicado anteriormente, depende de la actividad de las bacterias desnitrificantes. Si no existen problemas de separación del fango activo, el NT del efluente estaría relacionado con el proceso global de eliminación del nitrógeno, es decir, nitrificación-desnitrificación. Liu *et al.* (2008) relacionan el N-NO_3^- del efluente con la actividad de las bacterias nitrificantes, mientras que Hu *et al.* (2013b) utilizan el rendimiento del NT y la concentración del N-NO_3^- del efluente, lo cual podría ser poco acertado puesto que la configuración de la mayoría de los biorreactores estudiados en dichos trabajos disponen de selectores anóxicos. Algunos autores han utilizado otros criterios más indicados, como son los rendimientos del N-NH_4^+ y NT para relacionarlos con la comunidad de protistas (Serrano *et al.*, 2008b; Pérez-Uz *et al.*, 2007, 2009, 2010). El procedimiento para el cálculo de la capacidad de nitrificación no se indica en el trabajo realizado por Dubber & Gray (2011a), asociando el proceso de desnitrificación exclusivamente con la baja concentración del N-NO_3^- en el efluente. Estos resultados podrían no ser acertados si a su vez no se considera el N-NH_4^+ del efluente, puesto que es posible la presencia simultánea de valores bajos de N-NO_3^- y valores elevados de N-NH_4^+ , condición que indicaría una deficiente nitrificación, y como consecuencia, una escasa desnitrificación. Dicha afirmación tampoco sería acertada teniendo en cuenta que las EDAR estudiadas en el trabajo de Dubber *et al.* (2011a) disponen de selectores anóxicos. Jaromin-Glen *et al.* (2013) son los únicos autores que hasta el momento han valorado el nivel de significación de las variables relacionadas con el proceso de eliminación de nitrógeno, a través del test de Montecarlo previo al CCA, a pesar del escaso número de unidades experimentales empleadas en el estudio ($n=8$) y escasa serie temporal (2 meses).

Con el fin de unificar criterios y obtener resultados más fiables en la selección de los componentes del nitrógeno más adecuados para explicar la dinámica poblacional de protistas y metazoos y su valor bioindicador, se han explorado 14 variables: 4 correspondientes a la fracción total (NT, rNT, NKT, rNKT), 4 a la fracción total soluble (NKTs, rNKTs, NTs, rNTs) y 6 a las formas inorgánicas del nitrógeno (N-NH_4^+ , rN-NH_4^+ , N-NO_3^- , N-NO_2^- , $\%\text{N-NO}_2^-$, Nox). En principio no se ha excluido ninguna variable, a pesar de existir razones suficientes para prescindir de las fracciones totales debido a las pérdidas de biomasa producidas en los biorreactores QB, CT1 y CT2 durante los episodios de *foaming* y *bulking* filamentoso detectados.

De forma preliminar se ha realizado un análisis descriptivo de los componentes del nitrógeno, cuyos resultados han indicado la presencia de una elevada variabilidad del rNT en el conjunto total de los biorreactores. El análisis de los resultados ha permitido revelar la existencia de distancias significativas a partir del estadístico R y diferencias significativas utilizando las rutinas ANOSIM de 1 vía y PERMANOVA, respectivamente. Las variaciones entre los diferentes reactores son debidas al elevado rendimiento de eliminación del nitrógeno observado en DN y bajo en el caso de CT y CX, mientras que QB mostró rendimientos de eliminación del nitrógeno similares a DN. El análisis

de la influencia del factor estacional (prueba de Kruskal-Wallis y rutinas ANOSIM y PERMANOVA) indica que este no condicionó los rendimientos. Teniendo en cuenta que la baja temperatura es la que presenta una mayor influencia sobre la abundancia de las bacterias nitrificantes, de forma que la tasa de nitrificación se reduce a medida que disminuye la temperatura (Gerardi, 2002), la ausencia de un patrón estacional en este estudio podría ser debida a la operación con una adecuada EF durante los periodos más fríos (Zornoza *et al.*, 2012).

El PCA, aplicado a las fracciones del nitrógeno, ha permitido resumir y sintetizar la información de las 14 variables del nitrógeno en nuevos componentes explicando una fracción elevada de la variabilidad total. Según los resultados obtenidos, el primer eje define el proceso de nitrificación y nitrificación-desnitrificación con las siguientes variables: NT, rNT, NTs, rNTs, N-NH₄⁺, rN-NH₄⁺, NKT, rNKT, NKTs y rNKTs. El segundo eje se relaciona con variables que representan la nitrificación parcial (N-NO₂⁻, %N-NO₂⁻) y variables que podrían dar una información parcial sobre el estado del rendimiento de la desnitrificación (Nox y N-NO₃⁻). El análisis exploratorio del PCA indica que no parece existir una clara separación entre los procesos de nitrificación y nitrificación-desnitrificación. Estos resultados serían similares a los encontrados por Zhou *et al.* (2008), que relacionan directamente el NT y N-NH₄⁺ del efluente con en el primer componente extraído en el PCA. Contrariamente, Hu *et al.* (2013b) relacionan de forma directa el rNT con el N-NO₃⁻ del efluente en el segundo eje. La relación del rNT con el N-NO₃⁻ en un mismo eje del PCA podría darse cuando los rendimientos del NT no son muy elevados, y principalmente en ejes extraídos con baja variación explicada, como es el caso del trabajo de Hu *et al.* (2013b).

El CAP ha permitido también revelar aquellos componentes del nitrógeno que más han contribuido a la discriminación entre los biorreactores. Al tratarse de un análisis restringido, los vectores (componentes del nitrógeno) se encuentran relacionados con los nuevos ejes extraídos, siendo posible identificar el gradiente de los valores de los componentes del nitrógeno más correlacionados. El mayor potencial de dicha rutina multivariante se ha encontrado con la superposición del gráfico de burbujas (*bubble plot*), que permite visualizar la distribución de valores de la nube de puntos. Dicha herramienta ha sido de gran utilidad en la interpretación y valoración del alcance de los modelos de interpretación ambiental, que se discuten a continuación.

Santos *et al.* (2014) sugieren que la filtración de la muestra del efluente tratado es necesaria para la determinación de algunas variables fisicoquímicas, por ejemplo la DQO, cuando se busca su relación con las variables biológicas. La concentración elevada de los SST puede incrementar significativamente la fracción total de dichas variables, introduciendo un error en los resultados de los coeficientes de correlación, debido a una mala separación del fango activo. Por ello, se han excluido de la matriz el NT y el NKT en el análisis de colinealidad previo a la rutina BIO-ENV, ya que QB y CT presentaron problemas de separación del fango durante el estudio. La rutina BIO-ENV ha permitido explorar las mejores combinaciones de los componentes del nitrógeno, revelando los mayores coeficientes

de correlación respecto a los protistas y metazoos y sus grupos. La exclusión del rNT en las combinaciones seleccionadas a partir de la rutina BIO-ENV probablemente haya sido debido a que dicha variable incluye el nitrógeno procedente de los SST, teniendo en cuenta el escape producido de sólidos en el efluente tratado de los biorreactores QB y CT. Respecto a los componentes relacionados con el nitrito y nitrato, parece ser que el Nox ($N-NO_3^- + N-NO_2^-$) y la concentración de $N-NO_2^-$ no presentan una relación significativa, mientras que la concentración de $N-NO_3^-$ y el porcentaje de $N-NO_2^-$ respecto al Nox ($\%N-NO_2^-$) parecen influir significativamente en la variación de protistas y metazoos. La ausencia de relaciones significativas en el caso de Nox probablemente sea debida a que tanto el $N-NO_2^-$ como el $N-NO_3^-$ representan distintas situaciones en el proceso biológico. Los nitratos constituyen una variable dependiente del resto de componentes del nitrógeno, en cambio, el aumento del contenido en nitritos indicaría cierta inestabilidad en el proceso de nitrificación, al ser este un producto intermedio en dicho proceso. Por lo general, las concentraciones de este último compuesto alcanzadas en los reactores suelen ser inferiores a las alcanzadas por los nitratos, debido a que la oxidación de nitritos por las bacterias nitrificantes oxidantes de estos compuestos (BON) es bastante rápida. En ocasiones, en los biorreactores es posible detectar incrementos en la concentración de nitritos y concentraciones elevadas de nitratos, sin asociarse necesariamente a estados de inestabilidad. Por esta razón, probablemente el $\%N-NO_2^-$ (a partir del Nox) podría ser considerada una variable que exprese mejor la inestabilidad en la nitrificación, puesto que representa el contenido en nitritos respecto a los nitratos presentes. De esta forma, elevados $\%N-NO_2^-$ indicarían una “acumulación” de nitritos en el sistema, debido a sobrecargas orgánicas y/o inhibición de las BON.

La estrategia general para la búsqueda de organismos bioindicadores de la eliminación del nitrógeno a partir de modelos de regresión lineal múltiple multivariante basados en la distancia (DISTLM) se ha basado, en primer lugar, en la construcción de modelos individuales para cada uno de los biorreactores, y en segundo lugar, en la comparación de los resultados obtenidos en un modelo global a partir del conjunto de biorreactores (matriz total). Por otro lado, ha sido aplicado el principio de la parsimonia estadística en la construcción de los modelos lineales, es decir, ha sido seleccionada la combinación de variables explicativas (componentes del nitrógeno) más simple y reducida posible, teniendo en cuenta la varianza residual, la capacidad de predicción y el efecto de la colinealidad. Para encontrar dicha combinación se ha empleado el criterio *step-wise* y el procedimiento AIC_C (restrictivo en el incremento de las variables explicativas). La rutina BIO-ENV ha sido de gran utilidad para la exclusión de variables que mostraron elevada colinealidad, como por ejemplo el rNKT y Nox, mientras que el rNT se ha excluido para evitar errores debidos a la presencia del nitrógeno orgánico particulado de los SSLM del efluente. El componente rendimiento del nitrógeno kjeldhal total soluble (rNKTs) incluye la suma del rendimiento del nitrógeno orgánico soluble y amoniacal, mientras que el rNTs incluye la suma del rendimiento del nitrógeno orgánico soluble y el correspondiente teniendo en cuenta todas las fracciones del nitrógeno inorgánicas. El NKTs, el cual ha mostrado

colinealidad con el N-NH_4^+ y NTs, ha sido excluido por ser una variable cuyos resultados han sido muy similares al N-NH_4^+ .

El criterio *step-wise* y el procedimiento AIC_C no han podido ser empleados en la construcción de los modelos individuales para QB, CT2 y DN por ser muy restrictivos (selección de 1 sola variable), utilizándose por ello el criterio *forward* y procedimiento *adjusted R²* (menos restrictivo). El uso de dicho criterio y procedimiento conlleva la selección de variables no significativas, que en el caso de QB ha correspondido al rNKTs, en CT2 al N-NO_3^- y al N-NO_2^- , y por último en DN al N-NO_2^- y NTs, por lo que no han sido consideradas en su relación con los protistas y metazoos. El resultado de la selección de variables en los modelos lineales se encuentra condicionado por la distribución de sus valores. De esta forma, el N-NH_4^+ del efluente se ha seleccionado en los modelos de QB y DN, siendo la variable que más variación explica en el test secuencial y la de mayor coeficiente de correlación parcial con el eje que más contribuye a explicar la variación total de las variables biológicas (dbRDA1). Estos resultados corroboran los encontrados en el gráfico de burbujas del CAP, en el cual QB y CX muestran la mayor variación de N-NH_4^+ . La misma situación se observa en el caso del componente N-NO_3^- , el cual se ha seleccionado en los modelos de CT1 y DN, siendo también la variable que más contribuye a explicar la variación de los organismos y más correlacionada con el dbRDA1. Estos resultados también corroboran los encontrados en el gráfico de burbujas del CAP, los cuales han mostrado una variación significativa respecto a los biorreactores CT1 y DN. Por último, el NTs ha sido la variable que más variación biológica ha explicado y mayor correlación ha mostrado con el dbRDA1 del modelo de CT2. El rNKTs, NTs y N-NO_2^- se han ajustado significativamente en el resto de ejes extraídos de los modelos de CX y CT1, siendo menos importantes al contribuir en ejes que explican un menor porcentaje de variación.

El mejor modelo lineal de regresión múltiple multivariante para el conjunto de biorreactores (matriz total) ha seleccionado 8 componentes del nitrógeno que explican el 35,43% de la variación total de protistas y metazoos, mientras que 5 componentes explican el 29,78% de la variación total de sus grupos. El menor porcentaje observado en el caso de los grupos probablemente sea debido a la presencia de grupos formados por especies y géneros con diferentes asociaciones a los componentes del nitrógeno, como podría ser el caso del grupo de los peritricos. En el modelo correspondiente a los protistas y metazoos, el N-NH_4^+ ha sido seleccionado con el mayor porcentaje de variación explicada en el test secuencial y el rNKTs ha presentado la mayor correlación con el dbRDA1. En cambio, en el modelo de grupos el rNKTs es el componente que mayor variación y correlación ha mostrado.

Los coeficientes de correlación múltiple parcial de cada componente del nitrógeno con cada uno de los ejes extraídos del análisis de redundancia basado en la distancia (dbRDA) nos ha permitido definir aquellos componentes que mejor explican la variación de protistas y metazoos, así como determinar los ejes que mejor representan el proceso

de eliminación del nitrógeno. En el modelo correspondiente a protistas y metazoos, el primer eje del dbRDA ha definido el proceso de nitrificación a través de los siguientes componentes y en orden decreciente de correlación: $rNKTs$, $rN-NH_4^+$, $\%N-NO_2^-$ y $N-NH_4^+$. En el caso de los grupos, el primer eje se encuentra también definido por el rendimiento del proceso de nitrificación ($rNKTs$) y por la inestabilidad de dicho proceso a través del $\%N-NO_2^-$. El rendimiento en el proceso de nitrificación puede ser determinado directamente a través del $rNKTs$ y $rN-NH_4^+$. El mayor coeficiente de correlación observado del $rNKTs$ respecto al $rN-NH_4^+$ en el dbRDA1 en el modelo de protistas y metazoos, así como la ausencia del $rN-NH_4^+$ y elevada correlación del $rNKTs$ en el modelo de grupos y la exclusión del $rN-NH_4^+$ según el criterio BIC (el más restrictivo) en el modelo de protistas y metazoos, han revelado que la variable $rNKTs$ parece más adecuada que el $rN-NH_4^+$ para definir el rendimiento en el proceso de nitrificación y su relación con protistas y metazoos. Esto podría ser debido a que esta última variable, a diferencia del $rNKTs$, no incluye el nitrógeno orgánico soluble que puede ser oxidado en el reactor biológico a la forma amoniacal. Algunos autores han asociado el $rN-NH_4^+$ con la comunidad de protistas (Pérez-Uz *et al.*, 2010), mientras que no se han encontrado referencias que hayan explorado la variable $rNKTs$ en la búsqueda de bioindicadores de eliminación del nitrógeno. Es importante señalar que aunque los resultados indiquen que el $N-NH_4^+$ del efluente ha sido una variable excelente para definir el proceso de nitrificación, también podría serlo el $NKTs$, si bien esta última se ha excluido por presentar una elevada colinealidad con la primera. Probablemente, la variable $NKTs$ adquiera mayor importancia que el $N-NH_4^+$ en su relación con protistas y metazoos durante episodios severos de mala depuración, en los cuales se puede producir un incremento de este parámetro asociado a la fracción del nitrógeno orgánico soluble. El segundo eje en el modelo de protistas y metazoos representa de forma significativa exclusivamente el $N-NO_3^-$. En el caso de los grupos, el segundo eje representa el proceso completo de eliminación del nitrógeno a partir del rNT . Por último, el tercer eje del modelo de protistas y metazoos representa el $rNTs$ y NTs , definiendo igualmente los procesos de nitrificación-desnitrificación, mientras que el modelo de grupos han sido el $N-NO_3^-$ y $N-NO_2^-$. La aplicación de criterio BIC, más restrictivo que el AIC_C , ha excluido de los modelos las variables indicadas anteriormente como representativas en el dbRDA3 ($rNTs$, NTs , $N-NO_3^-$ y $N-NO_2^-$), además del $rN-NH_4^+$ ya discutido.

En resumen, los componentes del nitrógeno que representan el rendimiento del proceso de nitrificación influyen de forma significativa, tanto en la abundancia de especies como en la de grupos de organismos, mientras que los componentes que representan el rendimiento del proceso total de eliminación de nitrógeno (nitrificación-desnitrificación) han contribuido escasamente a las variaciones de las poblaciones biológicas. Además, tanto el NTs como el $rNTs$ (variables que representan los procesos de nitrificación-desnitrificación) se han excluido según el criterio BIC, lo que pone en evidencia su escasa importancia en el modelo respecto al resto de componentes. Los resultados indican que el rendimiento en el proceso de nitrificación es más relevante que los rendimientos en los parámetros que representan la nitrificación-desnitrificación para la monitorización del proceso de eliminación del

nitrógeno, según la abundancia de la población de protistas y metazoos. El proceso de desnitrificación, en condiciones anóxicas, depende principalmente de la presencia de nitrato como aceptor terminal de electrones y de las bacterias desnitrificantes, más abundantes en el fango activo que las nitrificantes. Por otro lado, las condiciones ambientales necesarias para que se lleve a cabo la nitrificación, representadas por las variables operacionales y fisicoquímicas del afluente y el licor mezcla, son mucho más estrictas que las requeridas en el proceso de desnitrificación, siendo el primero de ellos limitante en la eliminación del nitrógeno. Por ello, probablemente en los análisis estadísticos realizados las variables relacionadas con la desnitrificación no se han asociado con ningún parámetro biológico con el suficiente peso, no encontrándose microorganismos bioindicadores que representen dicho proceso. El elevado coeficiente de correlación observado entre el %N-NO₂⁻ y la concentración de N-NO₂⁻, así como la exclusión de este último en el modelo de grupos según el criterio BIC, nos ha permitido concluir que la inestabilidad del proceso de nitrificación se encuentra mejor representada por el % N-NO₂⁻, tal cual ha sido discutido anteriormente. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Jaromin-Glen *et al.* (2013), que indican una ausencia de significación del N-NO₂⁻ a partir del test de Montecarlo previo al análisis de correspondencias canónico (CCA) para la búsqueda de bioindicadores de eliminación del nitrógeno. Hasta el momento, no constan artículos publicados por otros autores que incluyan el %N-NO₂⁻ como variable relacionada con la inestabilidad del proceso de nitrificación, por lo que es la primera vez que se demuestra esta relación.

Los resultados obtenidos a partir del modelo unimodal para protistas y metazoos indican que el rNKTs es la variable que explica un mayor porcentaje de varianza dentro de la partición del CCA (pCCA) y, por lo tanto, más se correlaciona con el primer eje canónico y mejor representa el proceso de nitrificación. A partir de estos resultados, que corroboran los encontrados en el DISTLM, se propone la conveniencia del empleo de la variable rNKTs en lugar del rN-NH₄⁺ para la búsqueda de organismos bioindicadores del rendimiento de la eliminación del nitrógeno. Por otro lado, la relación directa encontrada entre el rNKTs y el rNTs en los dos primeros ejes canónicos del CCA, así como los ángulos agudos representados en el biplot, indican que tampoco fue posible a través de la ordenación canónica describir de forma independiente los procesos de nitrificación y nitrificación-desnitrificación. El segundo eje de ordenación quedaría definido por la variable N-NO₃⁻, formando un ángulo agudo con los vectores que representan el rNKTs y rNTs. Estos resultados indican que concentraciones elevadas del N-NO₃⁻ se dieron principalmente con valores elevados del rNKTs y rNTs y no con valores elevados del NTs, relacionándose directamente este último con el %N-NO₂⁻, N-NO₂⁻ y N-NH₄⁺. En el modelo unimodal, el % N-NO₂⁻ ha presentado un mayor porcentaje de varianza en el pCCA y un mayor coeficiente de correlación que el componente N-NO₂⁻, confirmando los resultados obtenidos en el DISTLM.

La búsqueda de bioindicadores del proceso de eliminación del nitrógeno a través del modelo lineal de regresión múltiple multivariante (DISTLM) y de ordenación canónica (CCA), han permitido la búsqueda de organismos

bioindicadores del proceso de nitrificación. Los gráficos de burbujas del análisis de redundancia basado en la distancia (dbRDA), que representan los componentes del nitrógeno seleccionados en los modelos construidos, han permitido revelar los rangos de dichos componentes asociados a protistas y metazoos y sus grupos. En el modelo unimodal se han representado exclusivamente aquellas variables relacionadas con el proceso de nitrificación: rNKTs, N-NH₄⁺, %N-NO₂⁻ y NTs (esta última se ha incluido en el análisis, debido a que los resultados de la ordenación indican que se encuentra influenciada por los valores de nitritos y amonio del efluente). La proyección perpendicular en el biplot del CCA de las distintas variables biológicas sobre el vector representado por el rNKTs ha permitido determinar la mayor o menor relevancia de los organismos bioindicadores del buen rendimiento del proceso de nitrificación, mientras que la proyección sobre el vector representado por el N-NH₄⁺ ha permitido ordenar los organismos bioindicadores de mal rendimiento del proceso.

5.2.1 Flagelados

Pequeños flagelados

Los pequeños flagelados se encuentran representados principalmente por *Bodo saltans*. Según nuestros resultados, la especie *Bodo saltans* estaría relacionada con rendimientos moderados-bajos de eliminación de nitrógeno (rNTs y rNKTs) en la EDAR CX, mientras que no se ha encontrado relaciones significativas en los modelos lineales del resto de biorreactores y en la matriz total. En el biplot del CCA esta especie se localiza cercana al origen de coordenadas en la dirección del incremento del N-NH₄⁺ del efluente, lo cual indicaría que su abundancia es mayor cuando no se está produciendo adecuadamente el proceso de nitrificación.

Según los resultados de las rutinas DISTLM-dBRDA y CCA, el grupo de pequeños flagelados, representados mayoritariamente por la especie *Bodo saltans*, no constituye un buen indicador de los parámetros relacionados con la eliminación del nitrógeno, ya que puede presentar elevadas abundancias con buenos rendimientos según algunos autores (Serrano *et al.*, 2008b; Pérez-Uz *et al.*, 2009, 2010), mientras que en otros estudios se propone una relación significativa entre bajos niveles de abundancia de los pequeños flagelados y el buen rendimiento de la nitrificación (Madoni, 1994b).

Grandes flagelados

El grupo de los grandes flagelados comprende en este caso dos especies: *E. sulcatum* y *P. trichophorum*. Los resultados obtenidos a partir del modelo lineal de grupos indican que son excelentes bioindicadores de elevado rNKTs y bajo %N-NO₂⁻, por lo que el grupo de los grandes flagelados es bioindicador de buenos rendimientos del proceso de nitrificación. Hu *et al.* (2013b) relacionan este grupo con valores elevados de N-NO₃⁻, si bien la concentración de

nitrito depende principalmente de la actividad desnitrificante. Otros autores han encontrado una correlación inversa baja y significativa de los grandes flagelados con la concentración de amonio del efluente, sin llegar a obtener resultados concluyentes sobre el potencial bioindicador respecto al rendimiento del proceso de nitrificación (Zhou *et al.*, 2008).

- ***Entosiphon sulcatum***

Los resultados del modelo lineal de los biorreactores QB y CX indican que es un excelente bioindicador de bajas concentraciones del N-NH₄⁺ en el efluente. Por otro lado, *E. sulcatum* ha sido relacionado en DN con valores inferiores a 4 mg/L de N-NO₃⁻ y coincidiendo con valores de NTs superiores a 6 mg/L, dentro del rango de 3,3-9,4 mg/L. Los resultados obtenidos a partir del modelo lineal de DN no son relevantes puesto que se trata de valores frecuentes dentro del buen rendimiento de eliminación del nitrógeno. Los resultados del modelo lineal de la matriz total indican que esta especie es muy buena bioindicadora de la eficiencia en el proceso de nitrificación, asociándose a valores de N-NH₄⁺ muy bajos y valores del rNKTs elevados. Por último, el CCA de la matriz total ha revelado que *E. sulcatum* se relaciona con los valores elevados del rNKTs y bajos de N-NH₄⁺, N-NO₂⁻ y %N-NO₂⁻ del efluente, siendo la especie más estrechamente relacionada con el rNKTs y los valores más bajos de N-NH₄⁺ del efluente.

Otros autores proponen una relación directa (análisis bivariante y PCA) con la concentración de nitratos del efluente, indicando buen rendimiento de la nitrificación (Hu *et al.*, 2013b), si bien ya se ha comentado que la concentración de nitratos no indica estrictamente como se está produciendo el proceso de nitrificación.

En base a los resultados obtenidos a partir del DISTLM-dBRDA y CCA, *E. sulcatum* es un excelente bioindicador de buenos rendimientos del proceso de nitrificación, siendo la primera vez que se demuestra a partir de rutinas estadísticas multivariantes de interpretación ambiental.

- ***Peranema trichophorum***

Los resultados del modelo lineal de los biorreactores ponen de manifiesto la tendencia del incremento de *P. trichophorum* con bajas concentraciones de amonio en el efluente. Los resultados del modelo lineal de la matriz total indican que es un excelente bioindicador del buen rendimiento del proceso de nitrificación, asociándose a valores de N-NH₄⁺ muy bajos, principalmente por debajo de 2 mg/L, y valores de rNKTs superiores al 75%, así como valores del %N-NO₂⁻ inferiores al 10%. Por último, el CCA de la matriz total ha revelado que la abundancia de *P. trichophorum* se relaciona con valores elevados del rNKTs y bajos de N-NH₄⁺, N-NO₂⁻ y %N-NO₂⁻, si bien su posición es posterior a *E. sulcatum* respecto al óptimo del rNKTs y valores más bajos de N-NH₄⁺ del efluente.

Como en el caso anterior, algunos autores indican una relación directa (análisis bivariante y PCA) de *P. trichophorum* con la concentración de nitratos del efluente, proponiendo esta especie como indicadora de buen rendimiento de la nitrificación (Hu *et al.*, 2013b), lo cual es muy discutible como ya se ha comentado. Los resultados tampoco concuerdan con los encontrados por Pérez-Uz *et al.* (2010), que indican que *P. trichophorum* podría considerarse un indicador indirecto de bajo rendimiento de eliminación de nitrógeno (rNT), al encontrarse relacionado (PCA) este con el rendimiento de la DQO. Tal cual se ha discutido anteriormente, el rNT no parece ser una variable muy adecuada para representar el rendimiento de eliminación del nitrógeno, principalmente cuando se producen pérdidas de SSLM durante episodios de mala sedimentabilidad del fango. Por otro lado, se trata de una relación indirecta a partir del PCA, análisis multivariante exploratorio cuya distancia euclídea utilizada no se ajusta a la mejor naturaleza del conjunto de datos biológicos, y donde la presencia de valores cero de densidad de organismos es muy frecuente (Ramette, 2007; Clarke *et al.* 2014).

En base a los resultados obtenidos a partir del DISTLM-dBRDA y CCA, *P. trichophorum* es un excelente bioindicador de buenos rendimientos del proceso de nitrificación, siendo la primera vez que se demuestra a partir de rutinas estadísticas multivariantes de interpretación ambiental.

5.2.2 Amebas

El grupo de las amebas se ha dividido en dos subgrupos: amebas testáceas y amebas desnudas (esta división no tiene carácter taxonómico). En este estudio se han identificado diversas amebas testáceas: *Centropyxis* sp., *Euglypha* sp., *A. vulgaris* y *P. operculata*, mientras que las amebas desnudas han sido diferenciadas en función del tamaño: amebas grandes (>50 µm) y amebas pequeñas (<50 µm). Los resultados del modelo lineal de grupos indican que las amebas desnudas y amebas testáceas son bioindicadores de elevado rNKTs y bajo %N-NO₂⁻.

Estos resultados no serían congruentes con los obtenidos por Hu *et al.* (2013b), que relacionan las amebas testáceas con buenos rendimientos del proceso de nitrificación al asociarse a elevadas concentraciones de N-NO₃⁻ en el efluente. Por el contrario, los resultados concuerdan con los propuestos por Madoni *et al.* (1993; 1994b), según los cuales las amebas testáceas (*Arcella* sp., *Diffugia* sp. y *Euglypha* sp.) se relacionan con un buen rendimiento de la nitrificación. Zhou *et al.* (2008) relacionan dicho grupo con bajas concentraciones de amonio en el efluente. Drakides (1978) y Poole (1984) observaron amebas testáceas solo en fangos activos de plantas depuradoras con baja carga del fango, alto TRHr y efluentes con una nitrificación completa. Por otro lado, algunos autores indican que en plantas donde se elimina eficazmente el nitrógeno, las amebas se encuentran ampliamente representadas, mientras que a medida que baja el rendimiento disminuye su frecuencia de aparición (Serrano *et al.*, 2008b; Pérez-Uz *et al.*, 2009, 2010).

En base a los resultados obtenidos a partir del DISTLM-dbrDA, tanto las amebas desnudas como las amebas testáceas se encuentran relacionadas con buenos rendimientos del proceso de nitrificación.

- ***Pixydicula operculata.***

Los resultados del modelo lineal del biorreactor CX indican que esta especie es bioindicadora de bajas concentraciones de N-NH_4^+ en el efluente. Los resultados del modelo lineal de la matriz total también señalan esta especie como un buena bioindicadora del buen rendimiento del proceso de nitrificación, asociándose a valores bajos de N-NH_4^+ y $\% \text{N-NO}_2^-$, y valores elevados del rNKTs. En la matriz total el coeficiente de correlación es moderado, probablemente debido a la baja abundancia encontrada en DN, biorreactor caracterizado (según el CAP) por el mayor gradiente del rendimiento de eliminación del nitrógeno. Por último, el CCA de la matriz total ha revelado que la abundancia de *P. operculata* se relaciona con valores elevados del rNKTs y bajos de N-NH_4^+ del efluente, siendo la segunda especie que se revela como indicadora en el *ranking* del óptimo del rNKTs y valores más bajos de N-NH_4^+ del efluente.

En base a los resultados obtenidos a partir del DISTLM-dbrDA y CCA, *P. operculata* es un buen bioindicador de altos rendimientos del proceso de nitrificación, siendo la primera vez que se demuestra a partir de rutinas estadísticas multivariantes de interpretación ambiental.

- ***Arcella vulgaris***

Los resultados del modelo lineal de CX, biorreactor donde se ha observado las menores densidades de población, indican que esta especie podría ser bioindicadora de bajas concentraciones de N-NH_4^+ en el efluente. Por otro lado, en el modelo lineal de CT1 los resultados indican una asociación con valores bajos de NTs, entre 17 y 40 mg/L, y de N-NO_3^- , entre 0,57 y 2 mg/L, mientras que en CT2 se ha asociado con valores de NTs bajos del efluente, entre 20 y 30 mg/L. Aunque los resultados del modelo lineal de la matriz total indican una relación con buenos rendimientos del proceso de nitrificación, el coeficiente de correlación es más bien moderado o bajo. En este caso, la baja correlación podría ser debida a la dificultad para diferenciar los individuos inactivos o en fase de enquistamiento en respuesta a condiciones ambientales adversas que son relevantes, por ejemplo, bajo situaciones de sobrecargas orgánicas y/o limitación de OD. Por último, el CCA de la matriz total ha revelado que la abundancia de *A. vulgaris* no presenta una relación altamente significativa con valores elevados del rNKTs y bajos de N-NH_4^+ del efluente, y sí con valores bajos del NTs. Dichos resultados estarían de acuerdo con la correlación moderada-débil encontrada a partir del modelo lineal de la matriz total y con la ausencia de relación significativa en QB, biorreactor donde se observaron elevadas densidades de *A. vulgaris*.

Los resultados de los modelos lineales corroboran los resultados de Madoni *et al.* (1993) que relacionan (PCA) el género *Arcella* sp. con una baja concentración de amonio en el efluente, proponiendo *Arcella* sp. como buen bioindicador del proceso de nitrificación. Esta relación entre una disminución de la frecuencia de aparición de *Arcella* sp. y el rendimiento de eliminación de nitrógeno ha sido propuesta también por otros autores (Serrano *et al.*, 2008b; Pérez-Uz *et al.*, 2009, 2010).

Aunque el modelo unimodal no ha revelado una clara relación con el rNKTs y N-NH₄⁺ del efluente, los modelos lineales indican que *A. vulgaris* es un organismo relacionado con buenos rendimientos del proceso de nitrificación. Debido a su capacidad de enquistamiento bajo condiciones ambientales adversas, podría estar presente de forma significativa en momentos puntuales en los cuales los rendimientos del nitrógeno no son elevados, siendo por tanto aconsejable valorar además la capacidad bioindicadora del resto de organismos presentes en el fango activo.

▪ Amebas desnudas grandes y pequeñas

Los resultados encontrados respecto al grupo de las amebas desnudas no han revelado diferencias entre amebas desnudas grandes (>50 µm) y amebas desnudas pequeñas (<50 µm). En el caso del modelo lineal de CX, las amebas desnudas han sido identificadas como organismos bioindicadores de bajas concentraciones del N-NH₄⁺ en el efluente. Aunque los resultados del modelo lineal de la matriz total indican una relación con buenos rendimientos del proceso de nitrificación, los coeficientes de correlación obtenidos han sido moderados-bajos, principalmente en lo que respecta a las amebas pequeñas. Por otro lado, el CCA ha revelado que la abundancia de amebas desnudas grandes y pequeñas no presentan una relación significativa con valores elevados del rNKTs y bajos del N-NH₄⁺ del efluente. Dichos resultados serían consistentes con la correlación moderada-baja encontrada a partir del modelo lineal de la matriz total.

Estos resultados estarían en parte de acuerdo con los encontrados por algunos autores, que relacionan las amebas desnudas pequeñas menores de 20 µm con buenos rendimientos de eliminación del nitrógeno (Serrano *et al.*, 2008b; Pérez-Uz *et al.*, 2009, 2010). En cambio, sería contrarios a los encontrados por estos mismos autores, que relacionan las amebas desnudas grandes (>50 µm) indirectamente y de forma secundaria con bajos rendimientos. Dichas discrepancias podrían ser debidas a la presencia de abundantes valores cero en la matriz de datos del PCA (Ramette, 2007; Clarke *et al.*, 2014).

En base a los resultados obtenidos a partir del DISTLM-dBRDA y CCA, las amebas desnudas no han mostrado un claro potencial bioindicador, siendo compatibles con buenos rendimientos en el proceso de nitrificación. Sería interesante que en futuros estudios las amebas desnudas fueran clasificadas y contabilizadas al menos a nivel de género.

5.2.3 Ciliados

Hipotricos

El grupo de hipotricos, en este estudio, se compone por las especies *A. cicada* y *E. affinis*. Los resultados del modelo lineal de grupos indican que los hipotricos son bioindicadores de bajo rNKTs y elevado %N-NO₂.

En base a los resultados obtenidos a partir del DISTLM-dbrDA, podemos concluir que los hipotricos son por tanto un grupo bioindicador de bajos rendimientos del proceso de nitrificación.

- *Euplotes affinis*

Los resultados del modelo lineal de los biorreactores QB y CX indican que es un excelente bioindicador de elevadas concentraciones de N-NH₄⁺ en el efluente, asociándose a valores generalmente superiores a 10 mg/L. Además, se ha relacionado en la matriz total con valores de N-NO₃⁻ superiores a 10 mg/L en el efluente. Por último, el CCA de la matriz total ha revelado que la abundancia de *E. affinis* se relaciona con valores bajos del rNKTs y elevados de N-NH₄⁺, N-NO₂ y %N-NO₂ del efluente, por lo que podría considerarse como indicador de bajos rendimientos del proceso de nitrificación y elevada concentración de N-NH₄⁺ en el efluente.

Algunos autores han encontrado una correlación inversa poco significativa de *E. affinis* con la nitrificación, sin llegar a obtener resultados concluyentes sobre su potencial bioindicador del rendimiento del proceso de nitrificación (Madoni, 1993).

En base a los resultados obtenidos a partir del DISTLM-dbrDA y CCA, *E. affinis* es un bioindicador de bajos rendimientos en el proceso de nitrificación, siendo la primera vez que se demuestra a partir de rutinas estadísticas multivariantes de interpretación ambiental.

- *Aspidisca cicada*

Los resultados del modelo lineal de CT1 y CT2 indican una asociación con los valores más elevados del NTs y más bajos del N-NO₃⁻ en el efluente. Por otro lado, los resultados del modelo lineal de la matriz total indican que es un bioindicador de bajo rendimiento del proceso de nitrificación, asociándose a valores elevados de N-NH₄⁺ y %N-NO₂, y valores bajos del rNKTs. Por último, el CCA de la matriz total ha revelado que la abundancia de *A. cicada* se relaciona con valores bajos del rNKTs y elevados de N-NH₄⁺, N-NO₂ y %N-NO₂ del efluente, ocupando una posición intermedia en el *ranking* del bajo rNKTs y elevada concentración de N-NH₄⁺ del efluente.

Estos resultados estarían en desacuerdo con los encontrados por Dubber & Gray (2011a) que relacionan *A. cicada* con baja concentración de nitratos en el efluente, proponiendo dicho organismo como bioindicador del proceso de desnitrificación. Las razones de dichas discrepancias podrían ser las siguientes:

- El análisis utilizado es bivariante, por lo que dicha correlación no implica causalidad. No se realiza un análisis multivariante para demostrar que existe una independencia entre la nitrificación y la desnitrificación
- En la tabla expuesta de coeficientes de correlación de Spearman, *A. cicada* se correlaciona positivamente con el NH_4^+ del efluente y negativamente con la variable nitrificación. Esto podría indicar una relación con un bajo rendimiento en la nitrificación, aunque la relación no es significativa y, por lo tanto, no es acertado asociar *A. cicada* a buenos rendimientos de la desnitrificación si a su vez se relaciona con bajo rendimiento de la nitrificación y elevada concentración de amonio en el efluente.

Contrariamente, los resultados estarían de acuerdo con el estudio descriptivo comparativo realizado por Poole (1984), en el cual encuentran la presencia de *A. cicada* principalmente en sistemas de plantas donde no se realiza un proceso de nitrificación. También estarían de acuerdo, en cierta medida, con los encontrados por Hu *et al.* (2013b) que relacionan *A. costata* con bajo rNT. Además, algunos autores han encontrado a *Aspidisca cicada* como la especie del grupo de los hipotricos más representativa en EDAR con rendimientos de eliminación de nitrógeno menores del 50% (Serrano *et al.*, 2008b; Pérez-Uz *et al.*, 2009, 2010).

En base a los resultados obtenidos a partir del DISTLM-dBRDA y CCA, elevadas densidades de *A. cicada* se asocian con bajos rendimientos del proceso de nitrificación. Dicha relación probablemente se encuentre influenciada por las elevadas densidades de población observadas en CT1 y CT2, biorreactores discriminados en el CAP por el gradiente de bajos rendimientos de eliminación del nitrógeno. Sin embargo, en biorreactores en los cuales esta especie se ha mostrado muy frecuente y abundante, como son QB, CXAB y CXCD, no se ha demostrado una relación significativa con los componentes del nitrógeno. Por ello, sería interesante continuar estudiando su relación con dichas variables con el fin de alcanzar resultados más concluyentes sobre su potencial bioindicador.

Filofaríngeos

El grupo de los filofaríngeos, en las EDAR estudiadas, se compone de las siguientes especies: *T. cucullulus*, *G. membranaceus*, *T. minuta* y *P. fluviatilis*. Los resultados del modelo lineal de este grupo de protistas indican su relación con valores elevados del rNKTs y bajos del %N- NO_2^- en el efluente tratado.

En base a los resultados obtenidos a partir del DISTLM-dBRDA, los filofaríngeos son un grupo bioindicador de buenos rendimientos de la nitrificación.

- ***Trochilia minuta***

Los resultados del modelo lineal del biorreactor QB indican que esta especie es bioindicadora de bajas concentraciones de N-NH₄⁺ en el efluente, asociándose a valores inferiores a 4 mg/L, mientras que en el biorreactor CX se asocia con valores de N-NH₄⁺ por encima de 10 mg/L. Teniendo en cuenta que los valores máximos de densidad absoluta en QB fueron mayores que en CXAB y CXCD, y que los mayores promedios fueron observados en DN, biorreactor con los mayores rNTs y bajas concentraciones de N-NH₄⁺, *T. minuta* parece asociarse con valores bajos de amonio en el efluente. Esta hipótesis se corrobora si se consideran los resultados en la matriz total, según los cuales la especie es bioindicadora del buen rendimiento del proceso de nitrificación, asociándose a valores bajos de N-NH₄⁺ y %N-NO₂⁻ en el efluente, y elevados del rNKTs. Por otro lado, dicho organismo ha sido también relacionado de forma significativa con valores elevados del rNTs. Por último, el CCA de la matriz total ha revelado que la abundancia de *T. minuta* se relaciona con valores elevados del rNKTs y bajos de N-NH₄⁺, N-NO₂⁻ y %N-NO₂⁻ del efluente, ocupando la cuarta posición en el *ranking* del óptimo del rNKTs y valores más bajos de N-NH₄⁺ del efluente.

Estos resultados estarían de acuerdo con los encontrados por otros autores que proponen la especie *T. minuta* como representativa de instalaciones con moderado y alto rendimiento de eliminación del nitrógeno, si bien esta relación no es significativa (Serrano *et al.*, 2008b; Pérez-Uz *et al.*, 2009, 2010). Estos resultados estarían parcialmente de acuerdo con los encontrados por Dubber & Gray (2011a), que indican una correlación de Spearman negativa con la concentración de N-NH₄⁺ del efluente, asociándose a valores inferiores a 2 mg/L. A pesar de la evidente relación de dicho organismo con el proceso de nitrificación, a través de su relación inversa con la concentración de amonio, dichos autores no obtienen una correlación significativa con la variable definida como “nitrificación”.

En base a los resultados obtenidos a partir del DISTLM-dBRDA y CCA, *T. minuta* es bioindicadora de buenos rendimientos del proceso de nitrificación, completando los resultados encontrados por Dubber & Gray (2011a), Serrano *et al.* (2008b) y Pérez-Uz *et al.* (2009, 2010).

- ***Pseudochilodonopsis fluviatilis***

Los resultados del modelo lineal del biorreactor CX indican que es un excelente bioindicador de bajas concentraciones de N-NH₄⁺ en el efluente. A pesar de encontrarse un promedio bajo de abundancia en CT1, dicho organismo incrementa su población con valores del NTs inferiores a 40 mg/L y con valores de N-NO₃⁻ superiores a 2 mg/L. Además, los resultados del modelo lineal de la matriz total indican que es un bioindicador del buen rendimiento del proceso de nitrificación, asociándose a valores bajos de N-NH₄⁺ y %N-NO₂⁻, y elevados del rNKTs. Por último, el CCA de la matriz total ha revelado que la abundancia de *P. fluviatilis* se relaciona con valores elevados

del rNKTs y bajos de N-NH_4^+ , N-NO_2^- y $\% \text{N-NO}_2^-$ del efluente, ocupando la quinta posición en el *ranking* del óptimo del rNKTs y valores más bajos de N-NH_4^+ del efluente.

En base a los resultados obtenidos a partir del DISTLM-dBRDA y CCA, *P. fluviatilis* es una especie bioindicadora de buenos rendimientos del proceso de nitrificación, siendo esta la primera vez que se demuestra a partir de rutinas estadísticas multivariantes de interpretación ambiental o en estudios realizados en EDAR.

Suctores

Las especies del grupo de los suctores encontradas han sido las siguientes: *M. mystacina*, *M. elegans*, *T. infusionum*, *T. lemnae*, *T. quadripartita*, *Trichophrya* sp., *Periacineta* sp. y *A. tuberosa*. Los resultados del modelo lineal de grupos de protistas indican que los suctores se relacionan con valores elevados del rNKTs y bajos del $\% \text{N-NO}_2^-$.

En base a los resultados obtenidos a partir del DISTLM-dBRDA, los suctores son un grupo bioindicador de buenos rendimientos del proceso de nitrificación.

▪ *Acineta tuberosa*

Los resultados del modelo lineal del biorreactor CX indican que esta especie es una excelente bioindicadora de baja concentración de N-NH_4^+ en el efluente. Por otro lado, *A. tuberosa* se ha relacionado en CT2 con los valores de NTs más bajos del efluente. Además, los resultados del modelo lineal de la matriz global indican que es un excelente bioindicador del buen rendimiento del proceso de nitrificación, asociándose a valores bajos de N-NH_4^+ y $\% \text{N-NO}_2^-$, y elevados del rNKTs. Por último, el CCA de la matriz total ha revelado que la abundancia de *A. tuberosa* se relaciona con valores elevados del rNKTs y bajos de N-NH_4^+ , N-NO_2^- y $\% \text{N-NO}_2^-$ del efluente, ocupando la tercera posición como bioindicador respecto al óptimo del rNKTs y valores más bajos de N-NH_4^+ del efluente.

Estos resultados no coinciden con los publicados por otros autores, que indican una relación directa (CCA) de *A. tuberosa* con la concentración de N-NH_4^+ del efluente (Jaromin-Glen *et al.*, 2013). Esto podría ser debido al escaso número de observaciones realizadas ($n=8$) y al estrecho rango de la variable rN-NH_4^+ (66-90%), mientras que en el presente trabajo se dieron rangos más amplios y, por lo tanto, más representativos ($n=140$ y $\text{rN-NH}_4^+=10-99\%$). Según Salvadó *et al.* (1995) es frecuente encontrar correlaciones contradictorias respecto a ciertas variables, ya que estas dependen del rango empleado en el estudio. Algunos autores han encontrado la especie *A. tuberosa*, aunque con densidades bajas, caracterizando la comunidad biológica en EDAR con alto rendimiento de eliminación del nitrógeno (Serrano *et al.*, 2008b).

En base a los resultados obtenidos a partir del DISTLM-dbrDA y CCA, *A. tuberosa* es un excelente bioindicador de buenos rendimientos en el proceso de nitrificación, siendo la primera vez que se demuestra a partir de rutinas estadísticas multivariantes de interpretación ambiental.

- ***Periacineta* sp.**

Los resultados del modelo lineal del biorreactor CX indican que es un organismo bioindicador de bajas concentraciones de N-NH₄⁺ en el efluente. Además, los resultados del modelo lineal de la matriz total indican que esta especie es bioindicadora del buen rendimiento del proceso de nitrificación, asociándose a bajos valores de N-NH₄⁺ y %N-NO₂⁻, y elevados del rNKTs. Por otro lado, este organismo ha sido también relacionado a partir de la matriz total con valores del rNTs aproximadamente del 50%. Aunque dichos resultados podrían indicar una asociación de *Periacineta* sp. con rendimientos moderados-bajos en la eliminación de nitrógeno, los resultados no son concluyentes debido a la escasa correlación encontrada con el tercer eje del dbrDA (cuya variación explicada es baja) y la ausencia de relación significativa de *Periacineta* sp. con el rNTs en QB y CX, biorreactores donde se alcanzaron las mayores densidades de población. El CCA de la matriz total ha revelado que la abundancia de *Periacineta* sp. se relaciona con valores elevados del rNKTs y bajos de N-NH₄⁺, N-NO₂⁻ y %N-NO₂⁻, ocupando la quinta posición en el *ranking* del óptimo del rNKTs y valores más bajos de N-NH₄⁺ del efluente.

En base a los resultados obtenidos a partir del DISTLM-dbrDA y CCA, *Periacineta* sp. es un protista bioindicador de buenos rendimientos del proceso de nitrificación, siendo la primera vez que se demuestra a partir de rutinas estadísticas multivariantes de interpretación ambiental.

Peritricos

Dentro del grupo de los peritricos se ha encontrado las siguientes especies: *C. polypinum*, *E. balatonica*, *E. chrysemidis*, *E. plicatilis*, *O. articulata*, *O. coarctata*, *O. microdiscum*, *Pseudovorticella* sp., *Zoothamnium* sp., *V. aquadulcis*, *V. convallaria*, *V. infusionum*, *V. microstoma* y *T. kellicottiana*. Los resultados del modelo lineal de grupos indican que este grupo no se relaciona significativamente con los componentes del nitrógeno. Algunos autores han propuesto una ausencia de relación del grupo de ciliados sésiles con la nitrificación (Madoni, 1994b), amonio en el efluente (Zhou *et al.*, 2008) y rNT (Hu *et al.*, 2013b), lo cual está de acuerdo con nuestros resultados, mientras que otros lo han asociado (PCA) a alta concentración de nitratos en el efluente (Liu *et al.*, 2008).

- ***Epistylis plicatilis*.**

Los resultados del modelo lineal del biorreactor CX indican que esta especie podría ser un protista bioindicador de bajas concentraciones de N-NH₄⁺ en el efluente. Los resultados del modelo lineal de la matriz total indican asimismo

que es un protista bioindicador del buen rendimiento del proceso de nitrificación, asociándose a valores bajos de N-NH_4^+ y $\% \text{N-NO}_2^-$, y elevados del rNKTs. Por otro lado, se ha relacionado en la matriz total con valores elevados del N-NO_3^- y medios del rNTs. Aunque dichos resultados parecen indicar una asociación de *E. plicatilis* con rendimientos moderados-bajos de eliminación del nitrógeno, los resultados no son concluyentes debido a la correlación moderada-baja encontrada con el segundo y tercer eje del dbRDA y a la ausencia de relación significativa de *E. plicatilis* con el rNTs en QB y CX, biorreactores en los que se detectó una densidad elevada de esta especie. Por otro lado, el CCA de la matriz total ha revelado que la abundancia de *E. plicatilis* se relaciona con valores elevados del rNKTs y bajos de N-NH_4^+ , N-NO_2^- y $\% \text{N-NO}_2^-$ del efluente, ocupando la cuarta posición en el *ranking* del óptimo del rNKTs y valores más bajos de N-NH_4^+ del efluente.

Los resultados concuerdan con los encontrados por Jaromin-Glen *et al.* (2013), a pesar del escaso número de observaciones y rango empleado en dicho estudio, que relacionan (CCA) a *E. plicatilis* con una baja concentración de amonio en el efluente. Por otro lado, Pérez-Uz *et al.* (2010) indican que *E. plicatilis* podría considerarse un indicador indirecto de bajo rendimiento de la eliminación del nitrógeno (rNT).

En base a los resultados obtenidos a partir del DISTLM-dbrDA y CCA, *E. plicatilis* es un bioindicador de buenos rendimientos del proceso de nitrificación.

▪ *Opercularia articulata*

Los resultados del modelo lineal en el biorreactor CX indican que esta especie es bioindicadora de bajas concentraciones de N-NH_4^+ en el efluente. Por otro lado, la densidad de esta especie aumenta en CT1, coincidiendo con bajos valores del NTs y elevados de N-NO_3^- , mientras que en CT2 se ha relacionado con los valores de NTs más bajos del efluente. Los resultados obtenidos en los distintos reactores concuerdan entre ellos, lo que pone de manifiesto la tendencia a encontrar abundancias elevadas de *O. articulata* cuando el efluente presenta bajos valores de amonio. Además, los resultados del modelo lineal de la matriz total indican que es un excelente bioindicador del buen rendimiento en el proceso de nitrificación, asociándose a valores bajos de N-NH_4^+ y $\% \text{N-NO}_2^-$, y elevados del rNKTs. Por último, el CCA de la matriz total ha revelado que la abundancia de *O. articulata* se relaciona con valores elevados del rNKTs y bajos de N-NH_4^+ , N-NO_2^- y $\% \text{N-NO}_2^-$ del efluente, ocupando la quinta posición en el *ranking* del óptimo del rNKTs y valores más bajos de N-NH_4^+ del efluente.

Estos resultados estarían de acuerdo con los encontrados por otros autores, que relacionan dicho organismo con periodos de buen rendimiento en la eliminación de nitrógeno, aunque no encuentran una relación significativa (Serrano *et al.*, 2008b; Pérez-Uz *et al.*, 2009, 2010). En el presente estudio la relación entre *O. articulata* y los componentes del nitrógeno indicados anteriormente ha sido claramente significativa, lo cual no coincide con la

propuesta de Madoni (1993), que relaciona el género *Opercularia* con bajos rendimientos del proceso de nitrificación, siendo dicho género propuesto en el SBI como característico de mal rendimiento en planta (Madoni, 1994b). Las especies incluidas dentro de dicho género en ambos estudios fueron las siguientes: *Opercularia coarctata*, *Opercularia minima* y *Opercularia microdiscum*, si bien según nuestros resultados no se recomienda incluir *O. articulata* para el cálculo del SBI.

En base a los resultados obtenidos a partir del DISTLM-dbrDA y CCA, podemos concluir que *O. articulata* es un bioindicador de buenos rendimientos del proceso de nitrificación, completando los resultados encontrados por Serrano *et al.* (2008b) y Pérez-Uz *et al.* (2009, 2010).

▪ ***Opercularia coarctata***

Los resultados del modelo lineal de los biorreactores QB y CX indican que este protista es un excelente bioindicador de elevadas concentraciones de N-NH₄⁺ en el efluente. Además, los resultados del modelo lineal de la matriz total indican que es bioindicador de bajo rendimiento en el proceso de nitrificación, asociándose a valores elevados de N-NH₄⁺ y %N-NO₂⁻, y bajos del rNKTs. Por otro lado, en las muestras de QB y CX de la matriz total se ha relacionado con valores elevados de N-NO₃⁻ en el efluente, lo cual podría ser debido a deficiencias en la desnitrificación, causadas a su vez por sobrecargas orgánicas y/o limitación de OD, y en consecuencia, un incremento de la DBO₅ del efluente (Salvadó *et al.*, 1995). Por último, el CCA de la matriz total ha revelado que la abundancia de *O. coarctata* se relaciona con valores bajos del rNKTs y elevados de N-NH₄⁺, N-NO₂⁻ y %N-NO₂⁻ del efluente, ocupando la primera posición en lo que respecta a un bajo rNKTs y una elevada concentración de N-NH₄⁺ del efluente.

Estos resultados estarían de acuerdo con el estudio descriptivo comparativo realizado por Poole (1984), en el cual *O. coarctata* es muy abundante en sistemas de plantas sin nitrificación. Por otro lado, también Madoni (1993) propone una relación entre *Opercularia* sp. y bajos rendimientos del proceso de nitrificación.

En base a los resultados obtenidos a partir del DISTLM-dbrDA y CCA, podemos concluir que *O. coarctata* es un bioindicador de bajos rendimientos del proceso de nitrificación, completando los resultados encontrados por Poole (1984) y Madoni (1993).

▪ **Complejo *Vorticella infusionum***

Los resultados del modelo lineal de CT1 indican una asociación con los valores más bajos del NTs y elevados de N-NO₃⁻. Además, se ha relacionado en la matriz total con valores elevados de N-NO₃⁻ en el efluente, principalmente de forma moderada-baja en muestreos de QB y CX, debido probablemente a la inestabilidad en la respiración

biológica de los nitratos. Por último, el CCA de la matriz total ha revelado que la abundancia de *V. infusionum* se relaciona con valores bajos del rNKTs y elevados de N-NH₄⁺, N-NO₂⁻ y %N-NO₂⁻ del efluente, ocupando la tercera posición entre las especies relacionadas con bajo rNKTs y elevada concentración de N-NH₄⁺ del efluente.

Estos resultados coinciden con la correlación positiva encontrada por Jaromin-Glen *et al.* (2013) entre *V. infusionum* y nitratos del efluente. Por otro lado, tal cual se discute posteriormente, y puesto que *V. infusionum* ha sido asociada por diferentes autores con sobrecargas orgánicas en el reactor biológico, cabría esperar una relación significativa con bajos rendimientos del proceso de nitrificación en los modelos lineales. La ausencia de correlación significativa puede ser debida a la baja frecuencia de aparición y densidad absoluta registrada durante el estudio, debido a que no se produjeron fuertes sobrecargas orgánicas en dicho periodo. A pesar de ello, el CCA ha revelado que su abundancia se corresponde con valores elevados de bajo rendimiento de la nitrificación. Sería interesante completar estos resultados con otros estudios donde la frecuencia y densidad absoluta de *V. infusionum* fueran más elevadas.

- **Complejo *Vorticella microstoma***

Según los resultados del modelo lineal del biorreactor QB, esta especie es bioindicadora de elevadas concentraciones de N-NH₄⁺ en el efluente. Además, se ha relacionado en la matriz total, a partir de coeficientes de correlación bajos, con valores elevados de N-NO₃⁻ en el efluente y medios del rNTs, debido probablemente a cierta inestabilidad en el proceso de desnitrificación (respiración biológica del nitrato). Por último, el CCA de la matriz total ha revelado que la abundancia de *V. microstoma* se relaciona con valores bajos del rNKTs y elevados de N-NH₄⁺, N-NO₂⁻ y %N-NO₂⁻ del efluente, ocupando la quinta posición en el *ranking* relacionado con un bajo rNKTs y una elevada concentración de N-NH₄⁺ del efluente.

En base a los resultados obtenidos a partir del DISTLM-dbrDA y CCA, podemos concluir que *V. microstoma* se ha relacionado con bajos rendimientos del proceso de nitrificación, corroborando los resultados encontrados por Poole (1984) y Madoni (1993, 1994b).

- **Complejo *Vorticella aquadulcis***

Los resultados del modelo lineal de los biorreactores QB y CX indican que esta especie es bioindicadora de elevadas concentraciones de N-NH₄⁺ en el efluente. Por otro lado, los encontrados en el modelo lineal de CT1 indican una asociación con los valores más elevados de NTs en el efluente y bajos de N-NO₃⁻. Estos últimos resultados estarían de acuerdo con los encontrados en QB y CX, poniendo de manifiesto la tendencia del incremento de *V. aquadulcis* con el aumento de amonio en el efluente. Además, los resultados del modelo lineal de la matriz total muestran que es un bioindicador de bajo rendimiento del proceso de nitrificación, asociándose a valores altos de N-NH₄⁺ y %N-NO₂⁻, y bajos del rNKTs. Por último, el CCA de la matriz total ha revelado que la abundancia de *V. aquadulcis* se

relaciona con valores bajos del rNKTs y elevados de N-NH_4^+ , N-NO_2^- y $\% \text{N-NO}_2^-$ del efluente, ocupando la quinta posición en el *ranking* de bajo rNKTs y elevada concentración de N-NH_4^+ del efluente.

Estos resultados estarían de acuerdo con los análisis exploratorios (PCA) realizados por Pérez-Uz *et al.* (2010), en los cuales se relaciona indirectamente *V. aquadulcis* con una mala eliminación del nitrógeno, al estar dicho organismo relacionado directamente con buen rendimiento de la DQO.

En base a los resultados obtenidos a partir del DISTLM-dbrDA y CCA, podemos concluir que *V. aquadulcis* es un bioindicador de bajos rendimientos del proceso de nitrificación, completando los encontrados por Pérez-Uz *et al.* (2010).

▪ Complejo *Vorticella convallaria*

Los resultados del modelo lineal de los biorreactores QB y CX indican que es un protista bioindicador de elevadas concentraciones de N-NH_4^+ en el efluente. Por otro lado, en CT2 ha sido asociado con valores elevados del NTs del efluente, mientras que la relación encontrada en CT1 no se considera significativa debido a la baja densidad de población encontrada. Además, se ha relacionado en la matriz total, principalmente de forma moderada-baja en muestreos de QB y CX, con valores elevados de N-NO_3^- en el efluente, debido probablemente a la inestabilidad en el proceso de desnitrificación. Por último, el CCA de la matriz total ha revelado que la abundancia de *V. convallaria* se relaciona con valores bajos del rNKTs y elevados de N-NH_4^+ , N-NO_2^- y $\% \text{N-NO}_2^-$ del efluente, ocupando la sexta posición en el *ranking* de bajo rNKTs y elevada concentración de N-NH_4^+ del efluente.

Estos resultados estarían de acuerdo con el estudio descriptivo comparativo realizado por Poole (1984), en el cual encuentran abundante a *V. convallaria* en sistemas de plantas sin nitrificación., así como con la relación de *V. convallaria* con una alta concentración de amonio en el efluente (PCA) que observan Martín-Cereceda *et al.* (1996), proponiendo esta especie como indicadora de ausencia de nitrificación.

Aunque los resultados del DISTLM-dbrDA de la matriz total no relacionen a *V. convallaria* directamente con bajo rNKTs y elevado N-NH_4^+ en el efluente, el CCA de la matriz total y los modelos lineales de QB, CXAB y CXCD han revelado una evidente asociación con bajos rendimientos del proceso de nitrificación, completando los resultados de Poole (1984) y Martín-Cereceda *et al.* (1996).

Haptoridos

Dentro del grupo de los haptoridos se han identificado las siguientes especies: *A. punctatus*, *L. lamella* y *A. uncinata*. Los resultados del modelo lineal de grupos indican su relación con valores elevados del rNKTs y rNTs, y bajos del %N-NO₂⁻.

En base a los resultados obtenidos a partir del DISTLM-dbrDA, el grupo de los haptoridos es un grupo bioindicador de buenos rendimientos en el proceso de nitrificación.

- *Acineria uncinata*

Los resultados del modelo lineal de CT1, biorreactor donde han sido observadas las densidades de población más bajas, han revelado una asociación con los valores más bajos de NTs y elevados de N-NO₃⁻ en el efluente. Además, *A. uncinata* se ha asociado en el mismo modelo con valores elevados de N-NO₂⁻. En cambio, en el resto de biorreactores, donde la abundancia ha sido más elevada, los distintos modelos no han revelado ninguna relación significativa de *A. uncinata* con los componentes del nitrógeno. Por otro lado, los resultados del modelo lineal de la matriz total indican una tendencia a relacionarse con buen rendimiento del proceso de nitrificación, si bien el coeficiente de correlación era moderado-bajo. Estos últimos resultados no deberían tomarse como concluyentes debido a la ausencia de relación significativa encontrada en los modelos lineales de los biorreactores DN, CXAB, CXCD, CT2 y QB. Por último, el CCA de la matriz total ha revelado que la abundancia de *A. uncinata* no presenta una relación significativa con valores elevados del rNKTs y bajos de N-NH₄⁺ del efluente.

Estos resultados serían consistentes con los encontrados por Pérez-Uz *et al.* (2010) que señalan la ausencia de una relación significativa entre *Acineria* sp. (principalmente *A. uncinata*) y el rendimiento de eliminación del nitrógeno, así como una ausencia de correlación significativa con el amonio del efluente (Martín-Cereceda *et al.*, 1995). Por otro lado, Dubber & Gray (2011a) sugieren que *A. uncinata* no es un organismo con potencial bioindicador, puesto que no presenta relaciones significativas con la calidad del efluente, tratándose de una especie muy común en los reactores biológicos. Algunos autores han descrito también a *Acineria uncinata*, como un ciliado común en plantas sin nitrificación (Poole, 1984).

Según los resultados obtenidos en los distintos modelos del DISTLM-dbrDA y CCA, *A. uncinata* no parece mostrar una clara capacidad bioindicadora del proceso de nitrificación.

Prorodóntidos

Dicho grupo, aunque con una frecuencia de aparición y densidad absoluta baja, se compone de las siguientes especies: *C. hirtus*, *Holophrya* sp. y *P. rouxi*. Los resultados del modelo lineal de grupos indican que se han relacionado con valores elevados del rNKTs y rNTs, y bajos del %N-NO₂⁻ del efluente.

Estos resultados concuerdan con los de otros autores, que caracterizan *Coleps hirtus* como un organismo con baja tolerancia al amonio (Bick, 1968). En el caso de *Plagiocampa rouxi*, esta se ha asociado (PCA) con un alto rendimiento en la eliminación del nitrógeno, aunque la relación no se mostraba significativa (Pérez-Uz *et al.*, 2009, 2010). Estos mismos autores también encuentran este organismo en plantas con eliminación de nitrógeno, mientras que otros, como Dubber & Gray (2011a), resaltan su tolerancia a condiciones anóxicas y anaerobias (característico de sistemas de eliminación de nutrientes). En el caso *Holophrya* sp, algunos autores han relacionado a *Holophrya discolor* con buenos rendimientos de eliminación del nitrógeno (Dubber & Gray, 2011a).

En base a los resultados obtenidos a partir del DISTLM-dBRDA, podemos concluir que los prorodóntidos son un grupo bioindicador de buenos rendimientos del proceso de nitrificación, si bien las especies no muestran un elevado potencial bioindicador.

5.2.4 Metazoos

El grupo de los metazoos se compone de los siguientes grupos: anélidos, gastrotrícos, nematodos y rotíferos, siendo este último el que mayor frecuencia y densidad de población ha presentado. Los resultados del modelo lineal de grupos indican que tanto los metazoos como los rotíferos se han relacionado con valores elevados del rNKTs y rNTs, y bajos del %N-NO₂⁻ en el efluente.

Estos resultados estarían de acuerdo con el estudio de Poole (1984), en el cual observan abundantes poblaciones de rotíferos en plantas nitrificantes, mientras que no serían consistentes con los encontrados por Hu *et al.* (2013b), que relacionan los metazoos y rotíferos con valores elevados del N-NO₃⁻ en el efluente, indicando buenos rendimientos del proceso de nitrificación, como ya se ha discutido.

En base a los resultados obtenidos a partir del DISTLM-dBRDA, podemos concluir que los metazoos y rotíferos son grupos bioindicadores de buenos rendimientos en el proceso de nitrificación.

- ***Rotaria sp.***

Los resultados del modelo lineal de los biorreactores QB y CX indican que es un excelente bioindicador de bajas concentraciones de N-NH_4^+ en el efluente. A pesar de encontrarse promedios bajos de abundancia en CT2, dicho organismo incrementa su población con los valores de NTs más bajos del efluente. Estos resultados serían consistentes con los encontrados en QB y CX, poniendo de manifiesto la tendencia al incremento de la población de *Rotaria sp.* con el descenso de amonio en el efluente. Además, los resultados del modelo lineal de la matriz total indican que es un excelente bioindicador del buen rendimiento del proceso de nitrificación, asociándose a valores bajos de N-NH_4^+ y $\% \text{N-NO}_2^-$, y elevados del rNKTs. Por último, el CCA de la matriz total ha revelado que la abundancia de *Rotaria sp.* se relaciona con valores elevados del rNKTs y bajos de N-NH_4^+ , N-NO_2^- y $\% \text{N-NO}_2^-$ del efluente, ocupando la quinta posición en el *ranking* respecto al óptimo del rNKTs y valores más bajos de N-NH_4^+ del efluente.

En base a los resultados obtenidos a partir del DISTLM-dbrDA y CCA, podemos concluir que *Rotaria sp.* es bioindicador de buenos rendimientos del proceso de nitrificación, siendo la primera vez que se demuestra directamente a partir de rutinas estadísticas multivariantes de interpretación ambiental.

- ***Lecane sp.***

Los resultados del modelo lineal de los biorreactores QB y CX indican que es un excelente bioindicador de bajas concentraciones de N-NH_4^+ en el efluente. A pesar de encontrarse promedios bajos de abundancia en CT, dicho organismo incrementa su población en CT1 con los valores más bajos de NTs, y elevados de N-NO_3^- . Por otro lado, en CT2 se ha relacionado con los valores de NTs más bajos del efluente. Estos resultados estarían de acuerdo con los encontrados en QB y CX, poniendo de manifiesto la tendencia al incremento de *Lecane sp.* con descensos de amonio en el efluente. Además, los resultados del modelo lineal de la matriz total indican que es un excelente bioindicador del buen rendimiento del proceso de nitrificación, asociándose a bajos valores de N-NH_4^+ y $\% \text{N-NO}_2^-$, y elevados del rNKTs. Por último, el CCA de la matriz total ha revelado que la abundancia de *Lecane sp.* se relaciona con valores elevados del rNKTs y bajos de N-NH_4^+ , N-NO_2^- y $\% \text{N-NO}_2^-$ del efluente, ocupando la quinta posición en el *ranking* del óptimo del rNKTs y valores más bajos de N-NH_4^+ del efluente.

En base a los resultados obtenidos a partir del DISTLM-dbrDA y CCA, *Lecane sp.* es bioindicador de buenos rendimientos del proceso de nitrificación, siendo la primera vez que se demuestra directamente a partir de rutinas estadísticas multivariantes de interpretación ambiental.

5.3 Influencia de las variables operacionales y fisicoquímicas en la dinámica poblacional de la comunidad de protistas y metazoos

La función de los protistas y metazoos ha sido objeto de numerosos estudios desde el desarrollo del sistema de fangos activos para la depuración de las aguas residuales. Entre los primeros trabajos que demostraron el importante papel de los protistas en las EDAR, destaca el de Curds *et al.* (1968) en el que se demuestra que la depredación de los protistas sobre las bacterias libres disminuía la turbidez del efluente, a la vez que aumentaba considerablemente el rendimiento del proceso. Desde entonces, han sido numerosos los trabajos que han ayudado a comprender mejor el papel de los protistas en el proceso. Puesto que la microbiota de protistas y metazoos es un componente biológico común en todos los procesos y debido a la relación entre la composición específica de estas comunidades y las variables de operación del reactor, su papel como organismos indicadores del proceso biológico se considera una herramienta esencial para el diagnóstico de los fangos activos. Los trabajos de Curds & Cockburn (1970a, b) fueron los primeros que propusieron una metodología más amplia, basada en la identificación de especies de ciliados y su relación con el rendimiento del proceso, considerando diferentes rangos de la DBO₅ del efluente. Drakides en 1978, basándose en la identificación de grupos, consideró la ecología de los protistas y su relación con otras variables como la CM y el TRH, obviados en numerosos trabajos hasta esa fecha.

Desde 1978 hasta la actualidad, han sido numerosos los estudios que han explorado la relación entre protistas, metazoos y variables operacionales y fisicoquímicas en EDAR (variables ambientales). Entre estos trabajos, cabe destacar aquellos que hacen referencia a la comparación entre especies presentes en fangos activos de EDAR a partir de la concentración de SSLM (Poole & Fry, 1980; Poole, 1984). Esteban *et al.* (1990) y Al-Shahwani *et al.* (1991) fueron los primeros que aplicaron el análisis de regresión múltiple y bivariado, incorporando algunas variables de planta como son la concentración de SSLM, el índice volumétrico del fango (IVF) y la CM. En general, el número de variables ambientales utilizadas para explicar la variabilidad biológica en fangos activos ha sido más bien baja en la mayor parte de los trabajos publicados (entre 2 y 7). Los dos trabajos que hasta el momento han explorado un mayor número de variables ambientales (12) han sido los realizados por Martín-Cereceda *et al.* (1995) y Esteban *et al.* (1991), siendo este último uno de los primeros estudios en utilizar el análisis de componentes principales para la búsqueda de asociaciones entre ciliados y variables de control de las plantas depuradoras. Otros trabajos en los que también se aplicaron metodologías multivariantes fueron los correspondientes a Cingolani *et al.* (1991, 1992), Cossignani *et al.* (1992), Madoni *et al.* (1993) y Becarés (1994).

Las variables fisicoquímicas del afluente (FQAF) han sido en general poco exploradas en los estudios realizados, destacando el caudal y la DQO del afluente, así como la carga de amonio (CN-NH₄⁺), los SST y la DBO₅. Por otra parte, se han publicado numerosos trabajos, principalmente a partir de ensayos de laboratorio, acerca del efecto de

diversos compuestos tóxicos en determinadas especies de protistas, destacando principalmente los trabajos sobre la influencia de determinados metales (Ni, Cd, Cu, Pb, Zn, Cr y Fe) realizados por Madoni *et al.* (1996) y Abraham *et al.* (1997).

Contrariamente, las variables fisicoquímicas del licor mezcla (FQLM) han sido exploradas con bastante frecuencia, como son la concentración de los SSLM y el IVF. La búsqueda de relaciones entre los protistas y el IVF se ha centrado principalmente en la búsqueda de bioindicadores de episodios de *bulking* filamentoso. La exploración de la concentración de los SSLM continua siendo una variable que suscita interés entre los investigadores, probablemente por su empleo en el cálculo de ciertas variables operacionales de diseño, como por ejemplo la EF y CM. Sin embargo, la T^a_r ha sido una variable poco explorada, a pesar de su gran influencia en la actividad biológica de los microorganismos.

En cuanto a las relaciones con variables operacionales (OPE), se han analizado principalmente la carga orgánica del afluente, el OD y la EF. Merece especial atención la diversidad de unidades empleadas para la expresión de la carga orgánica del afluente, lo cual ha llevado inevitablemente a dificultades en la comparación de los resultados obtenidos. El OD continua siendo una variable ambiental muy explorada por los investigadores para la búsqueda de organismos bioindicadores relacionados con el déficit de OD y, por consiguiente, de mal rendimiento del proceso de depuración. La EF ha sido otra de las variables ambientales elegidas en muchos de los estudios realizados, principalmente para la búsqueda de bioindicadores que permitan monitorizar de una forma rápida y en escaso tiempo la EF de operación de la planta. Destaca especialmente el trabajo publicado por Salvadó (1994), en el cual se propone un nuevo modelo de cálculo del tiempo de retención celular (MCRT, *mean cell residence time*) basado en las poblaciones de ciliados. La EF fue asociada con diferentes grupos de protistas y algunas especies y géneros en el desarrollo del SBI propuesto por Madoni (1994b) empleando análisis bivariado. Otras variables de operación han sido menos exploradas, como por ejemplo; el TRHr, y especialmente la carga total de nitrógeno (CNT) y fósforo (CPT) (Hu *et al.*, 2013a).

Hace 40 años, Curds realizó una descripción de los factores que deben considerarse para explicar el establecimiento y variación de la microbiota en los procesos convencionales de fangos activos y filtros percoladores. Actualmente, el diseño y empleo de nuevas tecnologías y sistemas de tratamiento biológico del agua residual, así como el avance en el conocimiento de la biología de los procesos de depuración, hacen necesario una revisión continua de los factores biológicos para esclarecer su importancia en el control, seguimiento y optimización de las EDAR. Por ello, nuestro trabajo se ha planteado partiendo de un mayor número de variables ambientales (32 en total), para explorar su relación con la variabilidad de la población de protistas y metazoos en los biorreactores estudiados. Hasta el momento, algunas de ellas no habían sido consideradas en los principales trabajos publicados, como por ejemplo: CMDQOs, TRHds, R.rec, CO_3 , CondLM, IVF5, NTLM, PTLM, DQOLM, %DQOs, DQO/DBO₅, CP-PO₄³⁻,

CCarb, CProt, CAG, CAGV, DBO₅/NT y DBO₅/NT. Además, se han utilizado las técnicas estadísticas multivariantes más avanzadas para la exploración e interpretación ambiental del proceso biológico, lo cual ha permitido un análisis exhaustivo de las características ecológicas de la población de protistas y metazoos en fangos activos.

5.3.1 Exploración de la inercia biológica de las variables operacionales

Una de las variables operacionales de diseño que sin duda más confusión genera entre los responsables de las instalaciones es la EF, pues es un parámetro muy fácil de comprender y calcular, pero muy difícil de utilizar en sistemas fuera del equilibrio, como son la mayoría (Salvadó & Canals, 2015). Junto con la EF, las variaciones de la CM, TRHr y OD, entre otras variables, provocan que los procesos biológicos se encuentren fuera del estado estacionario. Estas variables podrían ser consideradas en realidad covariables de la EF, frente a la respuesta de los microorganismos presentes en el fango activo. Las variables operacionales empleadas en el diseño de las EDAR son consideradas desde un punto de vista independiente, sin embargo, en la explotación se les debería de atribuir la condición de interdependencia. La fórmula para el cálculo de la EF, ampliamente difundida en los manuales de ingeniería del tratamiento de las aguas residuales, hace referencia a un estado ideal o estacionario que realmente no se da en la explotación diaria de las EDAR, pues el sistema se encuentra gobernado en realidad por una compleja interacción factorial de carácter multivariante. En este sentido, Salvadó (1994) propuso un modelo para fangos activos, en el cual se plantea una posible solución para la estimación de la EF en procesos reales con cambios continuos. Dicho modelo plantea la incongruencia de que si en un día no purgamos fangos en exceso y no se escapan sólidos en el efluente la EF tendería a infinito, lo cual carece de sentido. A partir de esta premisa, Salvadó propone que el incremento de la EF sea como máximo el tiempo transcurrido, a dicha EF la denomina edad biológica “ θ_b ” (es decir, si en un proceso un día no se extrae ni un gramo de lodo y el día anterior tenía 7 días de edad, tendríamos como máximo una EF de 8 días).

Para abordar la problemática que envuelve a la EF hemos propuesto un enfoque distinto del planteado por Salvadó (1994) y Salvadó & Canals (2015), basándonos en las ideas sugeridas por Becarés (1994) y los resultados obtenidos por Salvadó & Gracia (1993). Por un lado, Salvadó & Gracia (1993) compararon, utilizando el análisis de regresión lineal, distintos promedios de la CM respecto a los días anteriores al recuento de protistas con el índice de diversidad de Shanon & Weaver, llegando a la conclusión que el mejor coeficiente de correlación correspondía al promedio de los dos días anteriores al recuento. Por otro lado y consistente con dichos resultados, en el trabajo de Becarés (1994) se apuntaba la necesidad de tener en cuenta que ante las fluctuaciones de ciertos parámetros del afluente, la biomasa no reaccionaría inmediatamente, por lo que dependiendo de las causas, el uso de correlaciones cruzadas o la utilización de medias integradas pueden dar lugar a resultados más significativos (por ejemplo un choque tóxico

produce una respuesta inmediata, mientras que una alteración en el balance de nutrientes origina alteraciones más lentas).

En este trabajo se intenta responder a la siguiente pregunta: ¿cuándo tienen efecto en los procesos biológicos las modificaciones operacionales o los cambios respecto a la carga del afluente?, que en el caso de la EF sería, ¿cuándo tienen efecto en el proceso las purgas de fangos en exceso?, situación a la que hemos denominado “inercia biológica”. No todas las instalaciones purgan diariamente de forma regular y constante, ni siquiera a lo largo del tiempo. En este sentido, los resultados de nuestro trabajo demuestran que los biorreactores DN y QB presentaron un régimen de purgas muy irregular durante el periodo del estudio, a pesar de pertenecer este último a una instalación que trata una mayor carga orgánica afluente diaria. Además, el tamaño y el diseño de la instalación podrían influir con mucha probabilidad en dicha inercia.

Basándonos en estas premisas, en este trabajo se han explorado las inercias de los componentes biológicos con respecto al efecto de los siete días anteriores al recuento en el caso de la EF, y los tres días previos en el caso de la CM, CMDQOs, TRHr y TRHds. Para ello, se ha empleado la rutina no paramétrica de regresión múltiple multivariante BIO-ENV. La rutina BIO-ENV es un análisis ampliamente utilizado en estudios de ecología para buscar relaciones entre variables ambientales y biológicas, a través de la correlación de Spearman entre la matriz distancia biótica y la abiótica (Clarke *et al.*, 2014; Clarke & Gorley, 2015). La flexibilidad de las opciones de dicha rutina ha permitido su utilidad en fangos activos para realizar una aproximación de la inercia biológica, eligiendo el número máximo de combinaciones de variables ambientales (coincidiendo con el número máximo de variables a explorar) y eligiendo la selección de una sola variable como criterio en la rutina. De esta forma, se han obtenido los coeficientes de correlación de Spearman de cada una de las variables ambientales respecto a la matriz distancia biológica de protistas y metazoos. Los resultados de la rutina BIO-ENV han sido relevantes, puesto que se ha demostrado que los biorreactores estudiados presentaban distintas inercias respecto a la EF, CM, CMDQOs, TRHr y TRHds, lo cual probablemente se debe a las diferencias en el régimen de purgas de fangos en exceso, el diseño de los biorreactores, la carga orgánica y el caudal afluente. Las posibles incongruencias en los valores de EF debidas a la ausencia de purgas quedarían resueltas con esta rutina no paramétrica, puesto que a partir de ella se ha podido determinar la variable de la EF (entre EF1 y EF7) que contrarresta el efecto de la irregularidad de las purgas de fangos en exceso y permite aproximar la inercia en base a las características de la instalación. En definitiva, la selección de las variables con mayores coeficientes de correlación nos ha permitido aproximar la inercia biológica, y por lo tanto, construir los mejores modelos de interpretación ambiental de la matriz biológica en cada uno de los biorreactores, así como conseguir una mayor homogeneización de las variables ambientales en la construcción de modelos a partir del conjunto de los biorreactores (matriz total).

Una de las variables fisicoquímicas del afluente que a pesar de su fácil medición, probablemente más incertidumbre genera en el estudio de su relación con las variables biológicas es, sin duda, el OD. Aunque la mayoría de estudios indican en sus procedimientos los estadísticos descriptivos del OD medido (promedio, desviación estándar y rango de medición), no indican el lugar, la forma (puntual o en continuo) y la duración de la medición. Algunos estudios señalan que el valor se ha obtenido una vez al día (Puigagut *et al.*, 2009), en el momento de la toma de muestras del licor mezcla con un medidor de OD portátil (Dubber & Gray, 2011a) o a partir de medidores en línea (Leal *et al.*, 2013), mientras que otros no dan información detallada (Esteban *et al.*, 1991; Madoni, 1994b). El lugar, la forma y duración de la medida son muy importantes para poder valorar la influencia del OD respecto a la variabilidad microbiana. Las mediciones puntuales del OD son poco representativas puesto que representan el OD disponible en el momento de la medición, siendo muy frecuente variaciones diarias debidas a la incapacidad de los sistemas de aireación de llegar a la consigna del OD establecida durante periodos de sobrecargas (horas de comida, vertidos, etc.). El valor promedio diario del OD a partir de un medidor en línea puede no ser representativo cuando la desviación estándar es significativa. Además, es muy frecuente en las EDAR la práctica de la operación intermitente a través de ciclos de parada y marcha de los sistemas de aireación (soplantes, turbocompresores, etc.) para la eliminación de nutrientes y el ahorro energético, en cuyo caso los valores promedio no serían significativos debido a la elevada desviación de los valores. Por otro lado, algunos autores ya apuntaban que la concentración del OD debe tenerse en cuenta en otros aspectos del diseño y operación de los procesos, como son la permanencia de fangos en el decantador secundario (TRHds) y la sucesión de fases aerobias y anaerobias en procesos de eliminación de nutrientes o el control de las bacterias filamentosas (Becarés, 1994). Por esta razón, hemos considerado relevante la exploración del TRHds. Otro de los aspectos a tener en cuenta es el lugar en el cual se realiza la medición. En el caso de biorreactores dispuestos en serie o en aquellos diseñados en flujo en pistón, la demanda de OD será distinta según el punto de muestreo en el biorreactor. La inercia biológica del OD, de la misma forma que para el resto de variables señaladas anteriormente, deber ser también considerada. Con todo lo indicado anteriormente sobre los inconvenientes en la toma de datos representativos del OD en plantas depuradoras a escala real, parece lógico establecer que la obtención de valores representativos de dicha variable y su comparación entre distintas EDAR deberían ser valorados con extrema precaución. La representación del OD en la escala ordinal de porcentaje diario de ODb ($<0,8$ mg/L), ODm (0,8-2 mg/L) y ODa (>2 mg/L) nos ha permitido obtener valores más representativos que los valores promedio con elevada desviación estándar, sin embargo, esta forma de expresión no tendría en cuenta la prolongación en el tiempo de los valores medidos. Por esta razón, y por las limitaciones que supone el empleo de una escala ordinal para la representación del OD, los resultados del presente estudio deben ser considerados orientativos y no concluyentes.

La inercia biológica del OD, igual que en las variables anteriores, no ha sido hasta el momento explorada en trabajos anteriores. El análisis BIO-ENV ha permitido encontrar el valor del OD, respecto a los días anteriores del muestreo,

que más se correlaciona con la comunidad de protistas y metazoos. Además, se ha podido valorar cuales han sido las posiciones más relevantes, respecto a la demanda del OD de los medidores en línea de cada uno de los biorreactores. En el caso de QB y CX (CXAB y CXCD) no ha sido posible estudiar dicha posición puesto que solo se dispone de datos del medidor de la parte final del biorreactor (P3). En el caso del biorreactor DN, la mayor correlación del OD con la matriz biológica se ha observado en el primer reactor (P1) de los tres dispuestos en serie. Dichos resultados serían consistentes con la situación particular de DN, puesto que se trata de un proceso de baja carga orgánica, con la mayor demanda de OD en el primer reactor (P1). En el caso de la EDAR CT la situación es distinta, puesto que se trata de dos biorreactores en paralelo diseñados en flujo en pistón. En dichos biorreactores, debido a la demanda decreciente de OD a lo largo de los reactores, es razonable que en P1 se haya observado una mayor correlación de la matriz biológica con el ODb y que en P2 y P3 lo hayan hecho con el ODm y ODa, respectivamente.

5.3.2 Búsqueda de modelos de interpretación ambiental

Las relaciones entre protistas y metazoos y variables fisicoquímicas del licor mezcla (FQLM) y del afluente (FQAF) y operacionales (OPE) han sido estudiadas en la gran mayoría de los trabajos publicados a través del PCA y análisis bivariado, siendo probablemente Esteban *et al.* (1991) los primeros en utilizar dichas herramientas estadísticas. Respecto a los estudios más importantes publicados hasta el momento, son escasos aquellos que han utilizado técnicas estadísticas multivariantes de interpretación ambiental basadas en análisis propios (ordenación canónica), como por ejemplo; el RDA (Hu *et al.*, 2012, 2013a) y el CCA (Leal *et al.*, 2013). No nos constan referencias sobre relaciones entre protistas y metazoos y variables FQLM, FQAF y OPE a partir de modelos paramétricos y semiparamétricos de regresión lineal múltiple multivariante basados en la distancia. El presente trabajo es, probablemente, uno de los primeros en utilizar dichas herramientas numéricas basadas en el principio de la parsimonia estadística, es decir, seleccionando la combinación más simple y reducida de variables explicativas, teniendo en cuenta la varianza residual, la capacidad de predicción y la multicolinealidad.

Para entender el proceso de búsqueda de modelos de interpretación ambiental, así como las hipótesis planteadas, es necesario primero definir y exponer las diferencias entre lo que consideramos bioindicación directa e indirecta, a partir de la asignación de las variables explicativas y variables respuestas. Tal cual se ha indicado anteriormente, las variables ambientales de planta (CM, EF, etc.) han sido tradicionalmente relacionadas directamente con especies de protistas, metazoos y algunos grupos particulares (de ahí el término bioindicación directa), considerando las variables ambientales como explicativas y las biológicas como respuestas. Por otro lado, las propias variables ambientales de las EDAR pueden explicar directamente los rendimientos de eliminación de la materia orgánica y/o nutrientes, siendo estas últimas las variables respuestas. Una vez definidos ambos pares de relaciones, es posible asociarlas de

la misma forma planteada en el apartado anterior; los rendimientos y valores del efluente de los componentes del nitrógeno y/o materia orgánica pueden ser considerados variables explicativas frente a las biológicas (respuesta), puesto que dichas variables explicativas responden a su vez frente a las variables ambientales. A dicha relación podríamos denominarla bioindicación indirecta, la cual presenta claras ventajas frente a la directa. En las variables explicativas de la relación indirecta quedarían implícitas de alguna forma las posibles interacciones de dependencia de las variables ambientales, evitando la difícil tarea que supone explorar estas últimas.

Respecto a la bioindicación directa, se han planteado dos hipótesis en la búsqueda de bioindicadores de las variables ambientales, teniendo en cuenta que dichas variables (explicativas) pueden mostrar cierta interdependencia frente a la respuesta de la comunidad de protistas y metazoos. La primera de ellas es estudiar si, a partir del principio de parsimonia estadística que introduce la idea de modelos de ordenación con un número reducido de variables explicativas, se excluyen de los modelos construidos algunas variables en función de su agrupamiento. La segunda trata de probar si la variabilidad biológica explicada por la matriz de variables ambientales compuesta a partir del conjunto de todos los biorreactores (lo que denominamos matriz total), muestra diferencias significativas respecto a la explicada a partir de la matriz de cada uno de los biorreactores.

Para probar la primera hipótesis, las 32 variables ambientales han sido distribuidas en tres categorías, en función de las características fisicoquímicas del licor mezcla y afluente (FQAF y FQLM) y de una tercera categoría que incluye las variables de operación (OPE) más utilizadas en las EDAR. Una vez distribuidas según su tipología, la rutina de regresión múltiple multivariante BVSTEP ha seleccionado aquellas variables ambientales de cada uno de los biorreactores y del conjunto de todos ellos (matriz total) que más se correlacionan con la matriz distancia biológica y, por lo tanto, las más importantes para explicar la variabilidad de las poblaciones de protistas y metazoos. La misma rutina estadística ha sido realizada sin tener en cuenta la tipología, es decir, introduciendo las 32 variables. Los resultados comparativos han demostrado que el hecho de no tener en cuenta la tipología de las variables, ha causado la exclusión de ciertas variables ambientales de los modelos de ordenación, infravalorando por ello su importancia en la explicación de la variabilidad biológica. Algunas de las variables excluidas han correspondido a algunas variables OPE y FQAF. Dicha situación es consecuencia de la estrategia de búsqueda de modelos basada en el principio de la parsimonia, seleccionando un número reducido de variables. Uno de los ejemplos más claros sería la exclusión del modelo, sin categorizar variables, de la EF en los biorreactores de la EDAR CX. Dicho resultado no significa que la EF no sea una variable importante a considerar en la explicación de la variabilidad de protistas y metazoos en CXAB y CXCD, sino que, y tal como se discute posteriormente, ha sido la más relevante dentro de las variables OPE. Por tanto, según los resultados obtenidos parece razonable que en la difícil tarea de construcción de modelos de interpretación ambiental se considere además la exploración de las variables ambientales teniendo en cuenta su tipología.

Para probar la segunda hipótesis, hemos centrado la atención en los coeficientes de correlación de Spearman de la rutina BVSTEP. Dichos coeficientes disminuyeron, respecto a la mayoría de los modelos individuales de los biorreactores, al explorar la matriz total, tanto si se tiene en cuenta la tipología de las variables como si no. Estos resultados han permitido probar la segunda hipótesis, poniendo de manifiesto una posible dependencia entre las variables ambientales, que origina a su vez una pérdida de información de la variabilidad biológica cuando se procesan matrices totales compuestas por diferentes biorreactores. Nuestras observaciones estarían de acuerdo con Becarés (1994), que considera que la mayoría de variables ambientales incluidas en los estudios se encuentran estrechamente relacionadas o incluso son combinaciones lineales del sustrato del afluente, siendo mínima la ortogonalidad entre ellas.

Hasta el momento, ninguno de los artículos publicados sobre bioindicación de protistas y metazoos ha explorado previamente las variables ambientales en función de su tipología, siendo lo habitual la exploración conjunta de todas ellas. Además, la mayoría de los trabajos publicados han considerado series temporales de matrices compuestas por datos de varias EDAR. Los únicos trabajos en los cuales se han explorado individualmente las series temporales de los biorreactores, corresponden a los estudios de Al-Shawani & Horan (1991) en 2 EDAR durante 18 meses y Hu *et al.* (2012) en 1 EDAR con dos biorreactores con distinta configuración durante 14 meses.

Los resultados de las rutinas ANOSIM, PERMANOVA, nMDS y CAP han permitido revelar diferencias significativas en el espacio multivariante entre los biorreactores a partir de las variables ambientales y en función de la estacionalidad. Las diferencias espacio-temporales encontradas, como se discute posteriormente, han permitido construir distintos e interesantes modelos de interpretación ambiental para la explicación de la dinámica poblacional de protistas y metazoos.

El PCA de la matriz total nos ha permitido extraer nuevos ejes de variación (componentes principales), que resumen las variables ambientales. Los coeficientes de contribución de las variables a cada componente han sido generalmente bajos. Estos resultados serían consistentes con los bajos coeficientes de correlación encontrados a partir de la matriz total de variables sin categorizar de la rutina BVSTEP, poniendo de manifiesto una vez más la dependencia entre variables ambientales. El primer componente principal ha agrupado esencialmente las variables OPE y FQAF, obteniéndose algunas relaciones interesantes entre determinadas variables. Una de las relaciones más evidentes ha sido la relación inversa encontrada entre la EF y la CM, expresada esta última en términos de la DBO₅ y DQOs. Dicha relación inversa podría ser explicada teniendo en cuenta que un incremento de la carga orgánica afluente origina un incremento de la CM, y por consiguiente, se produce un aumento de la producción de biomasa (incremento de SSLM) y un incremento de las purgas de fangos en exceso (disminución de la EF). Estos resultados estarían de acuerdo con la relación inversa encontrada entre la CM y la EF por algunos autores a partir del análisis

bivariado (Zornoza, 2012a) y RDA (Hu *et al.*, 2012). Contrariamente, los resultados de Martín-Cereceda *et al.* (1996), que relacionan variables ambientales y protistas en 10 EDAR a partir de un análisis factorial, indican que no existe relación entre la CM y la EF. Los resultados del mencionado análisis factorial muestran una elevada contribución de la CM en el primer factor extraído (36,7% de varianza explicada), mientras que la EF lo hace en el sexto (4,7% de varianza explicada). Dichas discrepancias pueden ser debidas a los datos de la EF referidos a una de las EDAR estudiadas por Martín-Cereceda *et al.* (1996) (sistema orbal, OSU), indicando un rango de operación de la EF durante el estudio entre 30 y 230 días y un promedio de 75 días. Tal cual se ha discutido anteriormente, algunas instalaciones mantienen un régimen irregular de purgas de fangos en exceso, siendo muy común que en algunas ocasiones las purgas sean escasas o incluso que no se realicen purgas por el régimen de operación de la planta, en cuyo caso nos encontraríamos ante la incongruencia planteada por Salvadó (1994). En estos casos, y en base a nuestros resultados, se hace imprescindible explorar la EF a lo largo del tiempo para aproximar el valor más representativo de la instalación. De no ser así, los datos de EF serán elevados, como los señalados probablemente en el estudio anteriormente citado, y los resultados de asociación con la comunidad biológica poco acertados.

Otra de las relaciones observadas en el primer componente principal ha sido la correspondiente al TRHr y la EF-CM. La relación inversa entre el TRHr y la CM podría justificarse en una EDAR de la siguiente forma: el incremento del TRHr puede ser debido a una disminución del caudal afluente a la planta, provocando una disminución de la carga orgánica diaria afluente, y por consiguiente, una disminución de la CM (elevada EF). Estos resultados estarían de acuerdo con los encontrados por Esteban *et al.* (1991) que relacionan inversamente el TRHr y el caudal de entrada a la instalación. Por otro lado, también estarían de acuerdo con los encontrados por Hu *et al.* (2013) donde el TRHr y la EF se relacionan de forma directa. Algunos autores indican que la relación entre el alimento que entra en el sistema y la cantidad de microorganismos responsables de su degradación se encuentra generalmente ligado al tiempo de retención hidráulico (Becarés, 1994). En este sentido, podría darse el caso en el que dos instalaciones mantuvieran una misma CM (p. ej. 0,2 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d), pero diferentes TRHr (p. ej. 8 y 16 horas, respectivamente), si el TRHr fuera de 16 horas, a pesar de mantener la misma CM que con un TRHr de 8 horas, la carga orgánica permanecería el doble de tiempo en aireación en el reactor, lo cual produciría un efecto selectivo de especies con tasas bajas de depredación bacteriana. Un claro ejemplo de dicha situación se encuentra documentado en los experimentos de degradación de detergentes llevados a cabo por Pudo & Ernd (1981), demostrando que la variación del TRHr de 8 a 2 horas tenía un efecto sobre la microbiota mucho mayor que la propia concentración de detergentes. Con 4 horas de retención, *P. caudatum*, *C. margaritaceum* y *O. coarctata* eran dominantes, mientras que con 2 horas solo *V. microstoma* y *Cyclidium* sp. presentaban elevadas densidades de población. En base a ello, sería muy interesante que futuros estudios centraran parte de su atención en la exploración de la CM corregida por el TRHr.

Dentro de la categoría de las variables fisicoquímicas del licor mezcla (FQLM) se han encontrado algunas relaciones que presentan especial interés, como por ejemplo, la relación directa entre el %SSVLM y el nitrógeno total del licor mezcla (NTLM) y la relación inversa entre estas y el fósforo total del licor mezcla (PTLM). Estos resultados estarían de acuerdo con los encontrados en el estudio en una EDAR realizado durante un año por Zornoza (2012a), encontrándose relaciones idénticas a partir del análisis bivariado. En este mismo estudio, se relaciona también de forma inversa la T^a_r con el %SSVLM, estando ambas relacionadas directamente con el NTLM. El hecho que a partir de los resultados del PCA la T^a_r no se encuentre en el mismo componente que el NTLM y %SSVLM, no indica que no presente una relación con dichas variables. Como se discute posteriormente, el CCA y DISTLM-dbrDA han demostrado que efectivamente existe una relación inversa entre el NTLM y la T^a_r , mientras que la relación del elevado %SSVLM con baja T^a_r (principalmente en primavera e invierno) ha quedado demostrado a partir del análisis discriminante (CAP). Algunos autores han demostrado que las bajas T^a_r pueden contribuir al incremento de la concentración de proteínas en el flóculo (Wilén *et al.*, 2008). Estos resultados estarían de acuerdo con los encontrados en el presente trabajo, puesto que las proteínas contienen una elevada concentración de nitrógeno (NTLM). La relación directa encontrada entre el %SSVLM y NTLM podría justificarse porque esta última forma parte de la fracción volátil del licor mezcla.

Los valores del IVF pueden fluctuar en función de la abundancia de organismos filamentosos y de la T^a_r . Durante el periodo de estudio no se produjeron episodios severos de *bulking* filamentosos, por lo tanto, la discusión se ha centrado en la relación inversa encontrada entre la T^a_r y el IVF en el cuarto componente. El incremento de la T^a_r contribuye de forma directa al aumento de la velocidad de las reacciones bioquímicas de los microorganismos. Si suponemos una concentración de SSLM y carga orgánica diaria afluente más o menos constante, el incremento de dichas reacciones producirá un aumento de la oxidación de la materia orgánica por parte de las bacterias, y por consiguiente, un aumento de los residuos celulares (*debris*) principalmente en las zonas más internas del flóculo. Durante verano y principios de otoño se observa en las plantas depuradoras que un aumento de la proporción de núcleos (*debris*) coincide normalmente con una elevada velocidad de sedimentación del licor mezcla en el ensayo de la V30, disminuyendo los valores del IVF. Por esta razón, es común que se incrementen las purgas de fangos en exceso (disminución de la EF), contribuyendo así a reducir el consumo de OD, debido a un exceso de la respiración endógena. Por otro lado, durante las épocas más frías en la costa mediterránea (principalmente finales de otoño, invierno y mitad de primavera) es frecuente observar una velocidad de sedimentación más lenta del fango activo y un incremento del IVF, debido probablemente a la resistencia que ofrecen a la sedimentación las mayores concentraciones observadas de SPE durante dichos periodos. Esta relación ha sido demostrada en nuestro trabajo a partir del análisis canónico de coordenadas principales (CAP), indicando un incremento del IVF durante los periodos más fríos.

Respecto a las variables fisicoquímicas del afluente (FQAF), se observa un número elevado de variables directamente interrelacionadas en el primer componente principal. Dichas variables hacen referencia a la carga en el afluente de componentes del nitrógeno, fósforo, aceites y grasas, carbohidratos y proteínas, que se encuentran a su vez relacionadas directamente con la CM. Dicha relación es debida a que la CM es considerada una variable de carga orgánica genérica, puesto que su cálculo se realiza en base a la DBO₅ del afluente y, por lo tanto, un incremento de la carga orgánica puede asociarse a un incremento de variables orgánicas y algunas inorgánicas relacionadas con estas últimas. El CAP a partir de las variables ambientales y según el factor biorreactor ha permitido demostrar dichas relaciones.

La exploración de modelos de regresión lineal múltiple multivariante basados en la distancia (DISTLM), aplicando el principio de parsimonia estadística y la visualización de dichos modelos a través del análisis de redundancia basado en la distancia (dbRDA), han permitido ordenar la relación entre protistas y metazoos y las variables ambientales. Las dos hipótesis planteadas en la rutina BVSTEP han sido inicialmente planteadas también en la rutina DISTLM, a través de la cual se ha obtenido la variabilidad explicada por cada una de las variables ambientales en el modelo construido (test secuencial) a partir de procedimientos y criterios previamente seleccionados. Debido a las diversas combinaciones de variables ambientales reveladas a partir de la rutina BVSTEP, se han empleado procedimientos y criterios restrictivos para la selección de las variables explicativas según la metodología y recomendaciones propuestas por Anderson *et al.* (2008). La estrategia empleada ha sido explorar inicialmente el modelo con un procedimiento y criterio parsimonioso, como es el *step-wise* y AIC_C, respectivamente. Si el modelo ha seleccionado más de tres variables, se ha empleado un criterio más restrictivo (BIC), mientras que si han sido seleccionadas menos de dos variables, se ha empleado el procedimiento *forward selection* con el criterio *adjusted R*², menos restrictivo.

Los resultados obtenidos a partir de la rutina DISTLM han sido similares a los encontrados en la rutina BVSTEP, es decir, cuando son explorados modelos sin tener en cuenta la tipología de las variables, muchas de las variables OPE y FQAF, que previamente han sido seleccionadas con una elevada variabilidad biológica explicada cuando han sido categorizadas, quedan excluidas de los modelos individuales de los biorreactores. Además, cuando se explora la matriz de variables ambientales a partir del conjunto total de biorreactores (matriz total), la variabilidad biológica total explicada y los coeficientes de correlación de las variables biológicas con los ejes del dbRDA disminuyen respecto a la de algunos biorreactores, e incluso las variables seleccionadas son distintas. Además, el porcentaje de varianza explicada por las variables biológicas a partir de los modelos individuales de los distintos biorreactores en el CCA disminuye considerablemente cuando se construyen los modelos con los mismos tipos de variables ambientales a partir de la matriz total. Estos resultados ponen de manifiesto, una vez más, el efecto de dependencia entre algunas de las variables ambientales y, por consiguiente, una pérdida de información de la variabilidad biológica cuando se construyen modelos exclusivamente basados en la matriz total. Por todo ello, la estrategia seguida ha sido

la obtención de las principales conclusiones a partir de cada uno de los modelos lineales de los biorreactores, centrandose especialmente la atención en aquellas variables ambientales que han mostrado los porcentajes de variabilidad explicada más elevados, así como los mayores coeficientes de correlación con los primeros ejes extraídos del dBRDA. Las conclusiones obtenidas a partir de los modelos lineales de cada una de las categorías de variables ambientales basados en la matriz total, e incluso a partir del modelo sin categorizar variables, han permitido en algunos casos aportar más información y en otros corroborar las relaciones significativas observadas a partir de los modelos lineales individuales.

Los resultados del DISTLM han revelado la importancia de la EF frente a la CM en su relación con la comunidad de protistas y metazoos, explicando una elevada variabilidad en el caso de los biorreactores correspondientes a la EDAR CX. La CM ha resultado ser una variable que, según los modelos construidos, no ha permitido explicar de forma significativa la variabilidad de los protistas y metazoos, a excepción de la baja variabilidad encontrada en QB, revelando dos grandes grupos de organismos: aquellos influenciados por valores superiores a 0,16 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d y por debajo de dicho valor. Por todo ello, nuestros resultados sugieren que la EF es una variable que se relaciona de forma más directa con las variables biológicas que la CM, aunque como se discutirá posteriormente, la EF podría no ser un factor relevante en algunos casos. En general, se ha observado que el valor de la EF de 10 días parece dividir los organismos en dos grandes grupos, mientras que el valor de 20 días lo hace para la EDAR con mayores valores de la EF (DN). En el caso del valor de 10 días, nuestros resultados estarían de acuerdo con el trabajo de Al-Shahwani & Horan (1991) y de Salvadó & Canals (2015), a partir del cual encuentran variaciones en el número total de protistas.

La EF depende principalmente del régimen de purgas de fangos en exceso, siendo dicho régimen consecuencia de la mayor o menor carga orgánica diaria afluente al reactor. Contrariamente, la CM mantiene una relación indirecta con la población de protistas y metazoos, puesto que la carga orgánica del afluente (expresada como DBO₅ o DQOs) es utilizada como fuente de energía y recursos por las bacterias para su crecimiento, sirviendo estas a su vez de alimento para la mayoría de especies bacterívoras de protistas y metazoos. Además, hay que tener en cuenta que la concentración de SSVLM, utilizada para el cálculo de la CM, es una mera aproximación de la concentración de bacterias en el fango activo, dependiendo los SSVLM de la concentración de SPE, residuos celulares y de las células viables presentes. Además, cabe añadir que otra característica negativa a tener en cuenta sería la diversidad de unidades que han sido utilizadas para expresar la carga orgánica del afluente, lo cual ha llevado a confusión y dificultades en la comparación de los resultados obtenidos en diferentes trabajos. Algunas citas no hacen referencia a las unidades empleadas (Esteban *et al.*, 1991; Tyagi *et al.*, 2008), mientras que otras la expresan como d⁻¹ (Al-Shahwani & Horan, 1991), Kg/Kg.d (Madoni, 1993; Dubber & Gray, 2011a), Kg DBO₅/Kg SSVLM.d (Salvadó & Gracia, 1993; Lee *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2014), Kg DBO₅/Kg SSLM.d (Martín-Cereceda *et al.*, 1995, 1996; Hu *et*

al., 2012, 2013a), g DQO/g SSLM.d (Puigagut *et al.*, 2009) y g DBO₅/g SSLM.d (Curds & Cockburn, 1970b). Nuestros resultados sobre la importancia de la EF serían consistentes con la sucesión de las poblaciones de protistas y metazoos en función del MCRT demostrada por Salvadó (1994), teniendo en cuenta que, junto con el TRHr, son parámetros limitantes del medio físico a los cuales los microorganismos deben hacer frente para colonizar y establecerse en el fango activo (Salvadó & Canals, 2015). Con respecto a la CM, son escasos los estudios descriptivos completos en los que se ha podido obtener una relación entre dicha variable y la variación de protistas y metazoos (Sladka & Sladeczek, 1985; Salvadó & Gracia, 1993; Curds & Cockburn, 1970b). Algunos autores han apuntado que las tasas de asimilación del sustrato parecen correlacionarse más con la población de protistas y metazoos que la propia CM (Becarés, 1994), mientras que otros han desarrollado el concepto de “capacidad de permanencia” para determinar la capacidad de una especie de estar presente en el reactor (Salvadó & Canals, 2015). Este concepto de permanencia de una especie se basa en que, una vez acotados el estado nutricional del agua residual, las condiciones fisicoquímicas del medio y las interacciones tróficas, el TRHr y EF adquieren especial importancia como factores limitantes. Bajo determinados valores de estas últimas variables, serán la velocidad de reproducción y la afinidad del sustrato de la especie en cuestión, las que acabarán determinando la capacidad de la misma para estar presente en el reactor. En el caso de la afinidad del sustrato, Salvadó & Canals (2015) sugieren que la clasificación de los tres grandes grupos propuestos por Colin Curds (sésiles, reptantes y libres-nadadores) sería muy útil para enfatizar sobre la mayor probabilidad de permanencia de las especies más afines al flóculo en fangos activos; además, para hallar el potencial colonizador de los distintos componentes bióticos, se debe conocer la capacidad reproductora máxima de la microbiota según el modelo matemático desarrollado por Salvadó (1990). Los resultados del trabajo de Salvadó & Canals (2015) han permitido atribuir un número de divisiones por día (τ) a algunas especies de protistas y metazoos, siendo aquellas especies características de altas cargas las que mayores tasas de división tienen. Como se discute en apartados posteriores, nuestros resultados sobre la escasa relevancia de la variable EF y los coeficientes de correlación encontrados entre la CPT y las especies de protistas y metazoos, estarían de acuerdo con los resultados de dichos autores.

El TRHr se ha relacionado de forma significativa con la población de organismos en CX y CT1, siendo especialmente relevante en este último. Estos resultados estarían de acuerdo con los encontrados por Madoni *et al.* (1993) en un estudio realizado en 17 EDAR durante 1 año, en el cual relacionan (análisis bivariado) algunas especies de protistas con el TRHr. Otros autores también han encontrado un coeficiente de correlación de Spearman significativo entre el TRHr y la microbiota, empleando la rutina multivariante RELATE (prueba de Mantel) (Hu *et al.* 2013a). Por último, los resultados exploratorios (PCA) del estudio realizado durante 1 año en 2 biorreactores por Hu *et al.* (2013b), relacionan algunas especies de protistas y metazoos con el TRHr. Tal cual se ha discutido anteriormente, el TRHr presenta una estrecha relación con la carga orgánica afluente, por lo que sería interesante que futuras propuestas de criterios de carga para monitorizar el proceso tuvieran en cuenta dicha variable.

La EF y el TRHr seleccionan una determinada composición de las poblaciones bacterianas y consecuentemente, la de la microbiota que de ella se alimenta. Ambos tiempos de retención tienen además un efecto directo sobre la comunidad de protistas y metazoos en el sistema, puesto que solo aquellos con tasas de crecimiento superiores a los tiempos de retención podrán permanecer en el sistema. Salvadó & Canals (2015) demostraron que un determinado organismo puede presentarse en distintos rangos de la EF, siendo dicha variable un factor físico limitante para los organismos que pueden colonizar el fango. Por otro lado, Becarés (1994) indica que en sistemas convencionales no debería considerarse la EF como un factor determinante en la estructura de la población, puesto que la mayor parte de los protistas presentan tasas de crecimiento mucho más elevadas que las mantenidas en las purgas. Además, salvo cuando se tienen tiempos de retención muy breves que limitan claramente la composición del reactor; en el resto de los casos, la composición microbiana según el régimen de carga orgánica y las relaciones interespecíficas que se establecen serán los factores directos que afecten a la estructura de la población. Nuestros resultados estarían de acuerdo con las propuestas del mencionado autor, siendo los biorreactores con menores valores de EF y TRHr (CXAB, CXCD, CT1 y CT2) los que mayores porcentajes de variabilidad explicada por dichas variables han mostrado en el test secuencial, a partir de los modelos lineales de cada uno de los biorreactores. Además, la EF ha sido excluida de los modelos lineales de CX, CXAB, CXCD y del correspondiente a la matriz total, todos ellos a partir de matrices ambientales sin categorizar.

Entre las variables fisicoquímicas del licor mezcla (FQLM), la T^a_r ha demostrado ser la de mayor relevancia, observándose que, por lo general, el valor de 20 °C parece dividir los organismos en dos grandes grupos. Estos resultados estarían de acuerdo con los elevados coeficientes de correlación de Pearson encontrados por Chen *et al.* (2004), que relacionan algunas especies/géneros de protistas y metazoos con la T^a_r en un estudio realizado en 5 EDAR durante 1 año. Por otro lado, otros autores han encontrado un coeficiente de correlación significativo con la microbiota utilizando la rutina RELATE (Hu *et al.* 2013a). Por último, los resultados del PCA de Hu *et al.* (2013b) muestran las mayores cargas factoriales de la T^a_r e IVF en el primer componente, relacionando dichas variables con la comunidad de protistas y metazoos.

Tal cual se ha indicado anteriormente, han sido excluidas algunas de las variables operacionales (OPE) y fisicoquímicas del afluente (FQAF), y en algunos casos disminuido el porcentaje de variabilidad explicada, cuando la opción elegida en la construcción de modelos ha sido la no categorización de las variables ambientales. Continuando con el ejemplo de los biorreactores de la EDAR CX (CXAB y CXCD), el procedimiento y el criterio seleccionado en la construcción de los modelos han excluido del test secuencial a la EF, mientras que la T^a_r ha continuado manteniendo elevados porcentajes de variabilidad explicada. Estos resultados indican que la T^a_r tiene un efecto más directo que la EF en la variabilidad biológica, pero no que esta última carezca de importancia para la monitorización del proceso biológico. Un claro ejemplo que revela dicha tendencia, y que concuerda con nuestros resultados, se

encuentra documentado en el estudio realizado por Hu *et al.* (2013b), donde la T^{ar} muestra una elevada contribución a la varianza explicada en el primer componente del PCA (31,96%), mientras que la contribución de la EF se encuentra principalmente representada con menores valores en el segundo y cuarto componente, los cuales explican un menor porcentaje de varianza (14,10% y 6,70%, respectivamente). Estos resultados ponen de manifiesto, una vez más, el interés en explorar la relación entre protistas y metazoos y las variables ambientales teniendo en cuenta además la tipología de estas últimas, es decir, según sean variables OPE, FQAF o FQLM.

La EF se encuentra íntimamente relacionada con la T^{ar}, siendo común en la explotación de las EDAR la necesidad de incrementar la EF con la disminución de la actividad nitrificante a causa de las bajas temperaturas en el reactor (Gerardi, 2002). Los responsables de las instalaciones experimentalmente conocen que para un mismo valor de la EF, los microorganismos y las características microscópicas del flóculo son diferentes según se encuentre la temperatura del biorreactor. Sería interesante que futuros estudios centraran su atención en la exploración de nuevas variables OPE que fueran corregidas por la T^{ar}.

Entre las variables FQAF, la carga de aceites y grasas (CAG) y la carga de fósforo total (CPT) se han mostrado como las más relevantes, encontrándose esta última altamente correlacionada con la comunidad biológica y con niveles elevados de significación. La CPT ha sido incluso la variable con mayor influencia en la variabilidad de protistas y metazoos a partir del modelo lineal de la matriz total sin categorizar variables, observándose en todos los modelos que el valor de 15 g PT/Kg SSVLM.d divide los organismos en dos grandes grupos. Estos resultados serían congruentes con los encontrados en el estudio de Hu *et al.* (2013a), en el que se relacionan de forma significativa la microbiota con la CPT (rutina RELATE). Nuestros resultados respecto a la influencia de la CPT son concluyentes, la CPT sería un criterio de carga alternativo a la CM, siendo opuesta a la EF. La elevada relación encontrada de la CPT frente a la CM podría ser debida al carácter limitante del fósforo en el proceso biológico, siendo este además susceptible de formar precipitados con determinados cationes. La CM se encuentra relacionada con la materia orgánica afluyente, y por lo tanto, más vinculada con procesos del catabolismo bacteriano, mientras que el fósforo lo hace mayoritariamente con procesos de anabolismo o biosíntesis. El carbono, a pesar de ser un elemento esencial en la síntesis celular, no es un factor limitante en el agua residual afluyente, mientras que el carácter limitante del fósforo puede estimular el crecimiento celular en respuesta a un incremento de la CPT en el afluyente, y por consiguiente, provocar un mayor crecimiento de especies bacterívoras de protistas y metazoos con mayores tasas de depredación. Son numerosas las citas que atribuyen al fósforo este carácter limitante y estimulador frente al crecimiento bacteriano. Basu & Pick (1997) muestrearon 31 ríos para estudiar los factores relacionados con la abundancia de bacterias heterótrofas y flagelados, determinando que el principal factor desencadenante del crecimiento bacteriano era el fósforo total y no el carbono orgánico disuelto, asociando por tanto la abundancia de flagelados con el aumento del fósforo total. Destacan también los experimentos por Carlsson & Caron (2001), para

examinar el potencial limitador del crecimiento bacteriano por carbono orgánico (glucosa), nutrientes (amonio o fosfato) o ambos en un ambiente lacustre, llegando a la conclusión que el fósforo era el principal elemento limitante del crecimiento bacteriano. Respecto a la CAG, no nos constan hasta el momento referencias que relacionen dicha variable con protistas y metazoos.

El análisis de correspondencias canónico (CCA), englobado dentro de las técnicas multivariantes basadas en análisis propios, ha sido una herramienta numérica interesante para completar y corroborar, a través de una ordenación restringida, las relaciones encontradas en la rutina DISTLM-dbrDA, así como aproximar el óptimo ambiental de cada una de las especies/géneros de protistas y metazoos. Además, también ha permitido establecer las relaciones entre algunas variables ambientales, corroborando lo observado a partir del PCA. El CCA ha sido realizado exclusivamente en aquellos biorreactores cuyos ejes canónicos presentaron una longitud del gradiente superior a 1,5 SD (CX, CT y matriz total), valor por debajo del cual los resultados del modelo unimodal ofrecerían errores significativos en los resultados (ter Braak, 1988). Los resultados exploratorios del PCA de las variables ambientales coinciden con los encontrados en el CCA, en el cual la dirección y el ángulo de los vectores establecen la relación entre las variables ambientales. En general, en los modelos basados en el CCA se han incluido un mayor número de variables que en los modelos de regresión lineal múltiple multivariante basados en la distancia, debido a que los primeros utilizan criterios de selección menos restrictivos que estos últimos. Por esta razón, la CM (excluida en DISTLM-dbrDA) ha sido incluida en los modelos de ordenación del CCA, a pesar de ser una de las variables menos significativas a partir de la partición de la varianza del modelo canónico (pCCA). La relación inversa encontrada entre la CM-EF y el TRHr-CM coincide con la discutida en los resultados del PCA. El biplot de ordenación del CCA que relaciona protistas y metazoos y variables OPE a partir de la matriz total, muestra que la CM expresada como DQO soluble (CMDQOs) ha sido más significativa que la expresada como DBO₅. Estos resultados indicarían la posibilidad de utilizar la CMDQOs como variable alternativa y más práctica que la CM (empleando la DBO₅) para monitorizar el proceso biológico, debido a la rapidez en la determinación de la DQO del afluente frente a los cinco días necesarios para la DBO₅. Algunos autores han sugerido el interés de utilizar la DQO soluble frente a la DBO₅ en el cálculo de la CM como criterio de carga para monitorizar las EDAR (Zornoza *et al.*, 2012b).

El NTLM ha sido una de las variables ambientales en el análisis canónico de coordenadas principales (CAP) que ha contribuido mejor a la discriminación de los biorreactores CXAB y CXCD del resto, debido a los mayores valores encontrados en dichos biorreactores. En el modelo de ordenación del CCA, que relaciona las variables biológicas y FQLM, la relación inversa encontrada entre el NTLM y la T³r en CX, y de esta última además con el %SSVLM a partir de la matriz total, estarían de acuerdo con la relación ya discutida a partir del PCA de las variables ambientales. Por otro lado, el PTLM ha sido la variable en el CAP que más ha contribuido a discriminar los biorreactores CT1 y CT2, debido a los mayores valores del rango respecto al resto de biorreactores. Estas observaciones han sido

contrastadas a partir del mayor porcentaje de variabilidad explicada en la partición de la varianza del modelo canónico (pCCA) de la matriz total FQLM, así como en el mayor coeficiente de correlación observado en el dbRDA1 del DISTLM. Para evitar que esta situación particular del PTLM influya de forma significativa en los resultados de los modelos de ordenación, dicha variable ha sido excluida del modelo lineal y unimodal de la matriz total. En el modelo del CCA que relaciona las variables FQAF con protistas y metazoos a partir de la matriz total, las variables CCarb, CProt, CPT, CN-NH₄⁺, CAG y CAGV se encuentran relacionadas directamente entre sí. Estos resultados estarían de acuerdo con los encontrados a partir del PCA y CAP de las variables ambientales. Tal cual fue discutido anteriormente, la relación entre todas estas variables se debe a que se encuentran asociadas a la carga del afluente. Por último, el %DQOs también se ha mostrado como una variable de interés en la monitorización del proceso, relacionándose valores elevados de la misma principalmente con organismos característicos de elevadas tasas de crecimiento y típicos de cargas orgánicas moderadas-altas. El incremento de la fracción soluble de la materia orgánica origina un mayor porcentaje de sustrato disponible para el crecimiento y mantenimiento celular, y por lo tanto, un aumento de la población bacteriana y de protistas con altas tasas de depredación. Los resultados han demostrado que el %DQOs no es relevante cuando se consideran los datos del conjunto de biorreactores (matriz total), pues los rangos característicos de cada biorreactor son distintos y sus efectos en el reactor no comparables. Por esta razón, el %DQOs debe ser considerado de forma independiente, teniendo en cuenta que un incremento de dicha fracción puede comprometer la estabilidad del sistema. Nuestros resultados estarían de acuerdo con los encontrados por Zornoza (2012a), los cuales indican un efecto negativo en la eficiencia del proceso de nitrificación causado por el incremento del %DQOs del día anterior al análisis del licor mezcla.

A continuación, se discute el valor bioindicador de aquellas especies/géneros de protistas y metazoos que mostraron elevados coeficientes de correlación de Pearson con las distintas categorías de variables ambientales (OPE, FQLM y FQAF) a partir de los modelos lineales, y por tanto, información relevante para su interpretación ecológica en fangos activos y monitorización del proceso biológico. Dichas relaciones se han centrado en aquellas variables ambientales que a su vez presentaron los mayores coeficientes de correlación múltiple parcial con los ejes de dbRDA, correspondientes a los modelos de regresión lineal múltiple multivariante (DISTLM) construidos a partir de cada uno de los biorreactores y de la matriz total compuesta por todos ellos. A través del CCA ha sido posible aproximar la posición de cada una de las distintas especies y géneros respecto al gradiente de las variables ambientales asociadas.

5.3.2.1 Flagelados

Pequeños flagelados

- *Bodo saltans*

Los resultados del modelo lineal del biorreactor CT2 indican que valores de EF por debajo de 10 días influyen sobre la densidad de *B. saltans*, aunque la relación es moderada-baja. Dicha relación ha sido corroborada a partir del modelo unimodal de CX, además del elevado TRHr asociado a partir del modelo unimodal de CT1, situándose en ambos casos cerca del origen de coordenadas. A partir del modelo unimodal de la matriz total OPE ha sido posible corroborar ambas relaciones, junto con el incremento de la CMDQOs, donde también se sitúa cerca del origen de coordenadas. Por todo ello, nuestros resultados indican que *B. saltans*, no parece encontrarse influenciado por la EF, TRHr y CMDQOs. Nuestras observaciones estarían de acuerdo con los resultados de Salvadó & Gracia (1993) y Salvadó (1994) respecto a la asociación de los pequeños flagelados (<20 μm) con un amplio rango de la CM (principalmente por encima de 0,1 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d) y EF (θ_b), así como en la ausencia de relación significativa con el TRHr, EF y T^ar encontrada por Hu *et al.* (2013b). Algunos estudios han descrito elevadas tasas de crecimiento (r) para los pequeños flagelados, los cuales encuentran la r máxima más elevada, indicando por tanto su relación con elevadas cargas orgánicas y elevadas tasas de división (Salvadó & Canals, 2015). Sin embargo, nuestros resultados no concuerdan con los de Madoni (1994b), que indica una relación con bajos valores de la EF (análisis bivariado) y una asociación entre los pequeños flagelados y bajas concentraciones de OD y SSLM, así como con un mal rendimiento del proceso. En este sentido, Drzewicki & Kulikowska (2011) relacionan (análisis bivariado) el incremento de pequeños flagelados (<20 μm) con elevados niveles de la DQO (2342 ± 647 mg/L), DBO₅ (1582 ± 452 mg/L) y nitrógeno amoniacal ($162,4 \pm 48,1$ mg/L) en el afluente, los cuales determinarían una desestabilización del proceso.

Respecto a las variables FQLM, y siguiendo la tendencia observada a partir de las variables anteriores, los resultados han sido poco concluyentes. A partir de los modelos lineales tan solo ha sido posible relacionar dicha especie con un elevado IVF30, coincidiendo con un bajo %SSVLM en el biorreactor CT1. Los resultados obtenidos a partir de los modelos unimodales han sido similares a los anteriores, es decir, *B. saltans* se encuentra cerca del origen de coordenadas respecto al descenso de la T^ar y aumento del NTLM y %SSVLM, en el caso del biorreactor CX y matriz total FQLM. Por todo ello, nuestros resultados parecen indicar que *B. saltans* no muestra una clara influencia a partir de las variables FQLM descritas.

La relación más significativa encontrada de *B. saltans* con las variables FQAF ha sido la correspondiente a una elevada CProt a partir del modelo lineal de CXCD, siendo el protista que presenta un mayor coeficiente de correlación. Por

otro lado, hemos encontrado resultados contradictorios respecto a su relación con la DBO_5/PT , relacionándose con bajos valores a partir del modelo lineal de CT2 y elevados a partir del unimodal de CT1. Por último, los resultados obtenidos a partir del modelo unimodal de la matriz total FQAF tampoco han sido relevantes.

Como conclusión general debemos indicar que los resultados sobre la influencia de las variables ambientales en la dinámica poblacional de *B. saltans* han sido más bien escasos. Las únicas conclusiones derivadas de dichos resultados podrían ser que dicha especie no parece encontrarse relacionada con ninguna de las condiciones ambientales que favorecen el proceso de nitrificación, como son elevados valores de la EF y el TRHr, y la baja carga del afluente. Dichas observaciones podrían ser consistentes con los rendimientos medios de eliminación de nitrógeno asociados con dicha especie en el apartado anterior. La fijación temporal al sustrato es una característica singular de *B. saltans*, pudiendo encontrarse libre o asociado al flóculo a través del flagelo más largo. Las corrientes creadas a partir de los movimientos espasmódicos de dicho flagelo le permite alimentarse de bacterias y pequeñas partículas desprendidas del flóculo. Además, su capacidad de adhesión al sustrato parece indicar una mayor competitividad y capacidad de permanencia en el medio. A partir de estas premisas probablemente dicho organismo se encuentre favorecido más directamente por las características fisicoquímicas y biológicas del flóculo.

Grandes flagelados

- *Entosiphon sulcatum*.

Los resultados encontrados a partir de los modelos lineales de los biorreactores de la EDAR CX y matriz total OPE indican que valores de la EF por encima de 10 días influyen sobre la población de *E. sulcatum*. La correlación inversa encontrada en DN con la EF (referido al rango 8,4-40 días), asociándose a valores por debajo de 20 días, sugiere que su intervalo óptimo podría encontrarse entre 10 y 20 días. Además, los resultados a partir de los modelos unimodales de CX y matriz total OPE han permitido corroborar los encontrados a partir de los modelos lineales, revelando una clara asociación de esta especie con valores elevados de la EF, y bajos de la CM y CMDQOs en el caso de la matriz total OPE. Por otro lado, el modelo lineal de QB ha permitido demostrar la influencia sobre *E. sulcatum* de una baja CM, principalmente por debajo de 0,16 Kg DBO_5/Kg SSVLM.d, resultados que serían consistentes con el elevado TRHr asociado a partir del modelo unimodal de la matriz total OPE. Los resultados concuerdan con los de Salvadó & Gracia (1993) respecto a la mayor abundancia de flagelados $>20 \mu m$ en el intervalo 0,03-0,1 Kg DBO_5/Kg SSVLM.d. Por todo ello, nuestras observaciones sugieren que *E. sulcatum* es un excelente bioindicador de elevada EF, siendo la primera vez que se demuestra a partir de modelos de interpretación ambiental.

A pesar de que *E. sulcatum* ha sido asociado a valores de T^a_r por encima de 20 °C y bajos del NTLM a partir del modelo lineal de CX, el modelo lineal de la matriz total FQLM no ha mostrado una relación significativa con dichas

variables. Estos últimos resultados serían consistentes con la posición cercana al origen de coordenadas de *E. sulcatum* en la dirección del incremento de la T^a_r en el modelo unimodal de la matriz total FQLM. El modelo unimodal de CX ha corroborado los resultados de su modelo lineal, y revelado además, que *E. sulcatum* se encuentra formando parte del grupo de organismos cuyas abundancias se relacionan con los mayores valores de la T^a_r . Estas observaciones estarían de acuerdo con los resultados de Hu *et al.* (2013a, b), que indican una asociación moderada-baja (análisis bivariado, PCA y RDA) de *E. sulcatum* con elevada T^a_r en los 2 biorreactores estudiados (referido al rango 14-26,7 °C), así como con una elevada concentración de SSLM y bajo IVF y %SSVLM. Por otro lado, la relación de *E. sulcatum* con la baja CondLM de QB se debe principalmente a la relación directa entre la CondLM y la CM en dicho biorreactor, cuyos bajos valores podrían ser debidos a entradas de carga diluida en planta durante los periodos de lluvias.

La relación de *E. sulcatum* con valores de la CPT por debajo de 15 g/Kg SSVLM.d a partir de los modelos lineales de CXCD, matriz total FQAF y matriz total sin categorizar variables, sería consistente con la elevada EF asociada de forma significativa. Estos mismos resultados se han corroborado a partir del modelo unimodal de CX y matriz total FQAF, asociándose en este último a los valores más bajos de la CPT, CCarb, CProt y CN-NH₄⁺ del afluente. Por todo ello, nuestras observaciones sugieren que *E. sulcatum* es un excelente bioindicador de baja carga en el afluente, especialmente de la CPT.

La capacidad bioindicadora de *E. sulcatum* respecto al buen rendimiento en la nitrificación, discutido en el apartado anterior, estaría justificada por la influencia de la elevada T^a_r y EF, así como la baja carga del afluente. Algunos autores han señalado que dichas condiciones ambientales favorecen el rendimiento del proceso de nitrificación (Gerardi, 2002; Zornoza *et al.*, 2012b). Estos últimos autores lo asocian además a buenos rendimientos de eliminación de la DQO, DBO₅ y SST en el reactor biológico. Hasta el momento, y a excepción de los resultados exploratorios de Hu *et al.* (2013b), no constan estudios concluyentes que relacionen *E. sulcatum* con las variables ambientales de las EDAR a escala real, siendo la primera vez que se demuestra su relación a partir de rutinas estadísticas multivariantes de interpretación ambiental.

▪ *Peranema trichophorum*

De la misma forma que *E. sulcatum*, *P. trichophorum* se ha relacionado con valores de EF por encima de 10 días a partir de los modelos lineales de CXAB, CXCD y matriz total OPE. Sin embargo, su relación por encima de 20 días de EF en DN sugiere que *P. trichophorum* podría presentar un mayor rango de influencia a la EF que *E. sulcatum*. Los resultados contradictorios que relacionan *P. trichophorum* con baja EF en CT2 no han sido considerados relevantes debido a que la densidad absoluta observada en dicho reactor fue baja. Por otro lado, los resultados de los modelos unimodales de CX y matriz total OPE han permitido corroborar los encontrados a partir de los modelos lineales,

indicando su asociación con valores elevados de la EF, y bajos de la CM en el caso de la matriz total. Respecto a esta última variable, indicar que *P. trichophorum* parece mostrar en QB una elevada asociación con bajos valores, mucho mayor que *E. entosiphon*. Son escasos los estudios que relacionan dicho organismo con variables OPE, entre ellos destaca la relación moderada-baja (análisis bivariado) con elevada concentración de SSLM encontrada por Hu *et al.* (2013b). Por todo ello, nuestras observaciones sugieren que *P. trichophorum* es un excelente bioindicador de elevada EF, siendo la primera vez que se demuestra a partir de modelos de interpretación ambiental.

P. trichophorum también se ha encontrado asociado, igual que *E. sulcatum*, con elevada T^a_r y bajo NTLM a partir del modelo lineal y unimodal de CX. Además, la relación observada de *P. trichophorum* con la baja CondLM en QB es muy probable que también se corresponda con la relación directa mantenida entre la CondLM y la CM en dicho biorreactor, cuyos bajos valores podrían ser debidos a periodos de entrada de carga diluida en planta durante periodos de lluvias. Son escasos los estudios que relacionan dicho organismo con variables FQLM, entre ellos destaca la relación moderada-baja (análisis bivariado) con bajo IVF y %SSVLM (Hu *et al.*, 2013b). Dichos resultados podrían ser consistentes con la elevada EF y baja CM asociadas, considerando que dichos valores condicionan la mineralización del fango (menor fracción volátil), y por lo tanto, mayor compactación del mismo (menor IVF) en ausencia de una excesiva población de organismos filamentosos.

La relación de *P. trichophorum*, al igual que la encontrada para *E. sulcatum*, con bajos valores de la CPT a partir de los modelos lineales de CXCD, matriz total FQAF y matriz total sin categorizar variables, sería consistente con la elevada EF asociada de forma significativa. Estos mismos resultados han sido corroborados a partir del modelo unimodal de CX y matriz total FQAF, asociándose en este último modelo además a los valores bajos de CPT, CCarb, CProt y CN-NH₄⁺ del afluente. Además, ha sido asociado a bajos valores de la CAG a partir del modelo unimodal de QB. Por todo ello, nuestras observaciones sugieren que *P. trichophorum* es un excelente bioindicador de baja carga en el afluente, especialmente de la CPT.

La capacidad bioindicadora de *P. trichophorum* respecto al buen rendimiento de la nitrificación, discutido en el apartado anterior, estaría justificada por la influencia de la elevada T^a_r y EF, así como la baja carga del afluente. Son muy escasos los estudios que relacionan *P. trichophorum* con variables ambientales de planta a escala real, sin llegar a encontrar relaciones relevantes (Hu *et al.*, 2013b), siendo la primera vez que se demuestra su relación a partir de rutinas estadísticas multivariantes de interpretación ambiental.

5.3.2.2 Amebas

Amebas testáceas

- *Arcella vulgaris*

Los resultados de los modelos lineales indican que *A. vulgaris* se ha asociado con valores elevados de la EF, por encima de 10 días, en los biorreactores CXAB, CXCD, CT2 y matriz total OPE. Además, los resultados de los modelos unimodales de CX y matriz total OPE han permitido corroborar los encontrados a partir de los modelos lineales, revelando su asociación con valores elevados de la EF y bajos de la CM. Estos resultados estarían de acuerdo con los obtenidos por algunos autores, que asocian *Arcella* sp. con elevada EF (Madoni, 1994b). La ausencia de relación con la EF en DN, en el cual su presencia ha sido abundante, parece indicar que no se observa una variabilidad significativa en el intervalo de 8,4-40 días. Por todo ello, nuestros resultados sugieren que *A. vulgaris* es un excelente bioindicador de la EF. Por otro lado, dicha especie también ha sido relacionada a partir del modelo lineal y unimodal de CT1 con el incremento del TRHr. Dicha relación podría justificarse, como se ha discutido anteriormente, considerando que un incremento del TRHr puede ser consecuencia de una disminución del caudal, y por tanto, una posible disminución de la carga orgánica afluente. Estos resultados estarían de acuerdo con los encontrados por Madoni *et al.* (1993), que relacionan (PCA y análisis bivariado) *Arcella* sp. con un elevado TRHr, referido al rango de 3-100 horas. Además, también podrían estar de acuerdo con el análisis descriptivo realizado por Salvadó & Gracia (1993), en el cual encuentran los mayores valores promedio de *Arcella* sp. cuando el valor de la CM se sitúa por debajo de 0,2 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d. Por otro lado, Madoni *et al.* (1993) relaciona *Arcella* sp. con una baja CM (referida al rango 0,01-0,8 g/g.d), mientras que Santos *et al.* (2014) lo hace junto con baja concentración de la DBO₅ en el afluente, referido al rango de 0,1-1,4 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d. y 110-780 mg/L, respectivamente. Esto últimos autores también han relacionado dicho organismo con elevada concentración de SSLM y OD en el reactor biológico. Además, otros autores han encontrado también elevada abundancia y dominancia de *Arcella* sp. en fangos activos con baja CM (Chierici & Madoni, 1991). Por último, la relación moderada encontrada a partir del modelo lineal de CT1 en el dbRDA2 con el incremento de la CO₃ sería contraria a la encontrada a partir de su modelo unimodal, no obteniéndose por ello datos concluyentes respecto a la influencia de la aplicación de ozono para el control de bacterias filamentosas formadoras de espumas.

A. vulgaris ha mostrado (modelos lineales de CX, CT2 y matriz total FQLM) una clara asociación con valores elevados de la T^{ar} (>20 °C), coincidiendo con bajos valores del NTLM, IVF30 y %SSVLM, respectivamente, resultados que han sido corroborados a partir del modelo unimodal de CX y matriz total FQLM. Hasta el momento no constan referencias sobre una relación directa entre *A. vulgaris* y la T^{ar}, aunque algunos estudios han relacionado dicha variable indirectamente con el grupo de las amebas testáceas, compuesto por *Arcella* sp. y *Euglypha* sp., a través

de su relación con el proceso de nitrificación (Madoni *et al.*, 1993; Madoni, 1994b). Por todo ello, nuestras observaciones sugieren que *A. vulgaris* se encuentra muy influenciada por la T^a_r .

La relación encontrada con bajos valores de la CPT a partir del modelo lineal de CXCD, matriz total FQAF y matriz total sin categorizar variables, sería consistente con la elevada EF asociada de forma significativa. Estos resultados estarían de acuerdo con los elevados valores de la relación DBO_5/PT observados a partir del modelo lineal de CT2 y unimodal de CT1. Además, estas observaciones han sido corroboradas a partir del modelo unimodal de CX y de la matriz total FQAF, asociándose en este último a valores relativamente bajos de CPT, CCarb, CProt y $CN-NH_4^+$ del afluente. Dichas relaciones estarían de acuerdo con la baja CM asociada a esta especie por los autores anteriormente citados.

La influencia de elevados valores de la EF, TRHr y T^a_r , así como la baja carga del afluente, justificarían la asociación de *Arcella vulgaris* con buenos rendimientos del proceso de nitrificación discutidos en el apartado anterior.

- ***Pyxidicula operculata***

Los resultados de los modelos lineales indican que *P. operculata* se ha asociado con valores elevados de la EF, por encima de 10 días, en los biorreactores CXAB, CXCD y matriz total OPE. Además, los resultados de los modelos unimodales de la matriz total OPE y CX han revelado que su abundancia se encuentra influenciada por los valores más elevados de la EF. Por otro lado, la relación observada con elevada EF a partir del modelo unimodal de la matriz total OPE sería consistente con la baja CM y elevado TRHr asociados. Por todo ello, nuestros resultados sugieren que *P. operculata* es un excelente bioindicador de valores elevados de la EF, siendo la primera vez que se demuestra a partir de modelos de interpretación ambiental.

P. operculata ha sido relacionada a partir del modelo lineal de CX con elevada T^a_r y bajo NTLM, por encima de 20 °C. Estos resultados han sido corroborados a partir del modelo unimodal de CX y matriz total FQLM, en los cuales *P. operculata* se ha asociado con el valor de T^a_r más elevado de todos los protistas y metazoos identificados en las muestras. Además, se ha atribuido su presencia con los valores más bajos de NTLM en ambos modelos unimodales, y bajos del %SSVLM en el caso del modelo unimodal de la matriz total FQLM. Por todo ello, nuestras observaciones sugieren que *P. operculata* se encuentra muy influenciada por la T^a_r , característica ecológica que hasta el momento no ha sido documentada.

La relación encontrada con bajos valores de la CPT a partir del modelo lineal de CXCD, estarían en concordancia con la elevada EF asociada de forma significativa. Además, dichas observaciones han sido corroboradas a partir del modelo unimodal de CX y de la matriz total FQAF, asociándose en este último además a valores muy bajos de CPT,

CCarb, CProt y CN-NH₄⁺ del afluente. Por todo ello, nuestras observaciones sugieren que *P. operculata* es un excelente bioindicador de baja carga en el afluente, especialmente de la CPT.

La abundancia de *P. operculata* parece responder, respecto al resto de organismos, a los valores óptimos más altos de T^r y EF, y más bajos de CPT. Por esta razón, y tal cual se ha discutido en el apartado anterior, se presenta como un excelente bioindicador de condiciones óptimas del proceso de nitrificación. Hasta el momento no constan estudios concluyentes que relacionen *P. operculata* con las variables ambientales de EDAR a escala real, siendo la primera vez que se demuestra su relación a partir de rutinas estadísticas multivariantes de interpretación ambiental.

- ***Euglypha* sp.**

Nuestros resultados estarían de acuerdo con los observados por Madoni *et al.* (1993), que relacionan *Euglypha* sp. con valores bajos de la CM, referido al rango de 0,01-0,8 g/g.d, así como con los resultados de Salvadó & Gracia (1993), que encuentran las mayores densidades de población en el intervalo 0,03-0,1 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d. La relación inversa encontrada en QB entre la CondLM y dicho organismo podría ser debida a la carga diluida del afluente durante periodos de lluvia. La relación directa encontrada de *Euglypha* sp. con la EF por Madoni (1994b) sería consistente con la baja CM asociada.

Amebas desnudas

- **Amebas desnudas grandes (>50 μm)**

Según los resultados obtenidos, las amebas desnudas grandes podrían estar relacionadas moderadamente con una elevada EF a partir del modelo lineal de CX y de la matriz total OPE, por encima de 10 días. Por otro lado, la relación moderada-baja encontrada con elevado TRHr a partir del modelo lineal de CT1, así como la baja CM a partir del modelo lineal QB, las asocia con baja carga orgánica afluente al reactor. Estos resultados serían consistentes con las bajas tasas de crecimiento (*r*) descritas para gimnamebas >50 μm por Salvadó & Canals (2015), indicando por tanto su relación con cargas orgánicas moderadas-bajas. Por otro lado, el modelo unimodal de CX ha corroborado la relación de las amebas desnudas grandes con el incremento del TRHr, mientras que para la EF no se han obtenido resultados que corroboren las observaciones de los modelos lineales. Estos resultados estarían de acuerdo con los encontrados por Salvadó & Gracia (1993), que describen la mayor abundancia de gimnamebas >50 μm en el intervalo de 0,1-0,2 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d. Además, algunos autores han encontrado gimnamebas >50 μm en un amplio rango de valores de la EF (θ_b), aún sin mostrar una influencia evidente (Salvadó, 1994). Por último, las amebas desnudas grandes han sido asociadas en QB con valores del TRHds superiores a 6 horas. Dicha relación, observada en el biorreactor con mayor variabilidad del TRHds, podría indicar una mayor tolerancia a las condiciones

anóxicas/anaerobias generadas cuando aumenta el TRH en el clarificador secundario, y por lo tanto, mayor resistencia a periodos con bajos niveles de OD.

Las amebas desnudas grandes no parecen en general estar muy influenciadas por la T^a_r , atribuyéndose tan solo una relación moderada-baja con valores por encima de 20 °C a partir del modelo lineal de CX. Dicha relación no sería consistente con la encontrada a partir del modelo unimodal, situándose cerca del origen de coordenadas. Estos resultados podrían estar de acuerdo con el coeficiente de correlación directo moderado-bajo (análisis bivariado) encontrado entre *Mayorella* sp. y la T^a_r por Hu *et al.* (2013b), asociándola (análisis bivariado) también con bajos valores del IVF y %SSVLM de forma moderada-baja.

La relación encontrada con bajos valores de la CPT a partir del modelo lineal de CXCD, matriz total FQAF y matriz total sin categorizar variables sería consistente con la elevada EF asociada de forma significativa. En cambio, los modelos unimodales no parecen corroborar los resultados de los modelos lineales, situándose cerca del origen de coordenadas. Por otro lado, los resultados del modelo unimodal de CT1, que relacionan de una forma moderada-baja las amebas desnudas grandes con valores del %DQOs superiores al 40%, no serían consistentes con la baja carga afluente asociada, observaciones no consideradas relevantes debido al menor promedio de densidad absoluta respecto a otros biorreactores, como son CXAB y QB.

A pesar de la relación moderada-baja de las amebas desnudas grandes con elevada EF y baja carga afluente (CPT y CM), los modelos unimodales no han permitido corroborar de forma evidente dichas tendencias. Todo ello justificaría probablemente la ausencia del potencial bioindicador respecto al proceso de nitrificación discutido en el apartado anterior, a pesar de haber sido compatibles con buenos rendimientos de eliminación del nitrógeno. Como se ha sugerido en dicho apartado, sería interesante que en futuros estudios las amebas desnudas fueran clasificadas y contabilizadas al menos a nivel de género. Hasta el momento, y a excepción de Hu *et al.* (2013b), no constan estudios concluyentes que relacionen las amebas desnudas grandes con las variables ambientales de EDAR a escala real.

- **Amebas desnudas pequeñas (<50 μ m)**

Las amebas desnudas pequeñas han sido relacionadas con valores de EF por debajo de 20 días a partir del modelo lineal de DN, mientras que el resto de biorreactores y matriz total OPE no presentaron relaciones significativas con dicha variable. Por ello, nuestras observaciones indican que este grupo de amebas no parece encontrarse influenciado por la EF. En este sentido, algunos autores han encontrado gimnamebas <50 μ m colonizando un amplio rango de valores de la EF (θ_b), concentrándose las mayores densidades en el intervalo de 4-6 días (Salvadó, 1994). Además, algunos estudios han descrito elevadas tasas de crecimiento (τ) para gimnamebas <50 μ m, los cuales encuentran la

r máxima más elevada, indicando por tanto su relación con elevadas cargas orgánicas y elevadas tasas de división (Salvadó & Canals, 2015). Por otro lado, la relación significativa encontrada a partir modelo lineal de CT2 con bajo porcentaje del ODM en la posición 2, podría relacionarse con resistencia a condiciones de déficit de OD en el reactor. Nuestros resultados sobre el amplio rango de EF que parecen soportar las amebas desnudas pequeñas serían consistentes con un amplio rango de la CM, como sugieren Salvadó & Gracia (1993).

Las amebas pequeñas desnudas han sido asociadas a partir del modelo lineal de CT1 a bajo %SSVLM, coincidiendo con valores del IVF30 superiores a 100 mL/g, mientras que en CT2 lo han hecho con valores de la T^ar superiores a 20 °C, coincidiendo con valores del IVF30 inferiores a 100 mL/g. Por otro lado, los resultados de los modelos unimodales no han mostrado relaciones significativas con las variables FQLM. Por todo ello, nuestras observaciones indican que la relación entre amebas desnudas pequeñas y las variables FQLM no son concluyentes.

En lo que respecta a su relación con las variables FQAF, a pesar de su relación con baja CPT a partir del modelo lineal de CXAB y de la matriz total de variables sin categorizar, los resultados obtenidos a partir de los modelos unimodales no han mostrado evidencias que corroboren dicha asociación. Además, los resultados del modelo unimodal de CT1 que relacionan las amebas desnudas pequeñas con valores del %DQOs inferiores al 40% podrían estar indirectamente relacionadas con la baja carga del afluente. Por otro lado, la relación encontrada a partir del modelo lineal de QB con baja CNi podría dar indicios de sensibilidad frente al níquel.

Las distintas relaciones encontradas respecto al grupo de las amebas desnudas de pequeño tamaño con las variables ambientales en los diferentes biorreactores, así como la ausencia de relaciones significativas concluyentes a partir de los modelos lineales y unimodales, podrían indicar que dentro de dicho grupo se encuentran géneros/especies con distintas características ecológicas. Los resultados discutidos en el apartado anterior han mostrado que no existen diferencias según el tamaño de las amebas desnudas, respecto a su relación con los rendimientos del proceso de nitrificación. Por todo ello, sería interesante que las amebas desnudas pequeñas, igual que las grandes, fueran clasificadas en futuros estudios de bioindicación a nivel de género/especie, con el fin de revelar si existen diferencias respecto a su relación con las variables ambientales y/o rendimientos del proceso biológico.

5.3.2.3 Ciliados

Hipotricos

- *Aspidisca cicada* (*A. costata*)

A. cicada se ha asociado en QB con valores del TRHds superiores a 6 horas. Dicha relación, observada en el biorreactor con mayor variabilidad del TRHds, podría ser debida a la mayor tolerancia a condiciones

anóxicas/anaerobias generadas cuando aumenta el TRH en el clarificador secundario, y por lo tanto, una mayor presencia en periodos con bajos niveles de OD. Dichas observaciones podrían ser consistentes con la asociación encontrada por Dubber & Gray (2011a) entre *A. cicada* y la baja concentración de OD, mientras que serían contrarias a los resultados de Santos *et al.* (2014) en los que se encontró relación (análisis bivariado) entre esta especie y valores elevados de OD (referido al rango 0,6-2 mg/L). Toman & Rejic (1988) sometieron a las poblaciones de fangos activos a periodos no aireados de 24 horas, observando que *A. cicada*, junto con *V. microstoma* y *P. caudatum*, eran más resistentes que otras especies a condiciones anóxicas. Por otro lado, según los resultados obtenidos en este trabajo a partir de los modelos lineales, la abundancia de *A. cicada* en CT2 y matriz total OPE se asocia con valores bajos de la EF, principalmente por debajo de 10 días. Dicha asociación sería consistente con la baja abundancia de *A. cicada* observada en DN, biorreactor que mostró un promedio y rango de EF superior. Además, se ha observado un incremento de *A. cicada* con la disminución de la EF en DN, relacionándose su abundancia con valores inferiores a 20 días. Los resultados de los modelos lineales han sido corroborados por el modelo unimodal de CX, en el que *A. cicada* se relaciona con el descenso de la EF. A pesar de que a *A. cicada* se le ha relacionado con un amplio rango de las variables ambientales, nuestras observaciones sugieren que las mayores densidades de población se presentan cuando existen valores bajos de la EF. Los resultados de Salvadó (1994) indican que *A. cicada* puede colonizar fangos con un amplio rango de la EF (θ_b), aunque las mayores densidades de población parecen encontrarse por debajo de 10 días, lo cual estaría de acuerdo con nuestras observaciones. Además, Hu *et al.* (2013b) encontraron una correlación inversa moderada-baja (análisis bivariado) de *A. cicada* (antes *A. costata*) con la EF, referido al rango 5,3-45,3 y 3,9-33 días. La relación encontrada con un bajo TRHr, a partir del modelo lineal y unimodal de CT1, podría explicarse de forma indirecta por la baja EF asociada a la mayor abundancia de *A. cicada* dentro del rango de CM de 0,2-0,4 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d (Salvadó & Gracia, 1993). Los resultados de estos últimos autores estarían parcialmente de acuerdo con los encontrados por Curds & Cockburn (1970b), los cuales observan *A. costata* en valores de hasta 0,55 g DBO₅/g SSLM.d, aunque las mayores frecuencias de aparición corresponden al intervalo de 0,12-0,22 g DBO₅/g SSLM.d. Además, Leal *et al.* (2013) indican una relación (CCA) de *Aspidisca* sp. con una elevada concentración de la DQO en el afluente, referido al rango 193-758 mg/L. Los resultados de Lee *et al.* (2004), que relacionan (PCA y análisis bivariado) *A. cicada* con la CM y EF en 2 líneas de tratamiento en planta piloto en una EDAR, ponen de manifiesto que la interpretación de los coeficientes de correlación entre organismos y variables ambientales dependen del rango de medida de estos últimos (Salvadó *et al.*, 1995). En este sentido, Lee *et al.* (2004) asocian a *A. cicada* con la baja CM (rango 0,07-1,63 y 0,39-1,74 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d), cuyas conclusiones podrían ser similares a la relación con elevada CM (>0,2) descrita por Salvadó & Gracia (1993). Resultados similares han sido obtenidos por Martín-Cereceda *et al.* (1996) y Santos *et al.* (2014) que relacionan *A. cicada* con una baja CM, referida al rango 0,02-1,4 g DBO₅/g SSLM.d y 0,1-1,4 g DBO₅/g SSVLM., respectivamente. Además, Santos *et al.* (2014) la relacionan con baja concentración de la DBO₅ y DQO en el afluente, referidos al rango 110-780 y 400-

1647 mg/L, respectivamente. Por otro lado, Lee *et al.* (2004) también relacionan *A. cicada* con alta EF (rango 1,1-2,7 y 0,5-3 días), consistente con el bajo rango de EF asociado en el presente trabajo. Contrariamente, algunos autores han sugerido que *A. cicada* es igual de abundante en fangos activos con diferentes intervalos de carga, desde baja hasta alta carga (Madoni, 1991). Por último, la relación directa encontrada de *A. cicada* con el incremento de la CO_3 , tanto a partir del modelo lineal como del unimodal de CT1, daría indicios de cierta resistencia a la exposición del ozono.

El incremento de la población de *A. cicada* parece responder al descenso de la T^{ar} , por debajo de 20 °C, según el modelo lineal y unimodal de CT1. Además, dicha asociación ha sido corroborada a partir del modelo unimodal de CX y matriz total FQLM, aunque en este último no mostró valores extremos. En cambio, los modelos lineales del resto de biorreactores y matriz total FQLM, a pesar de demostrar una asociación inversa con la T^{ar} , lo hicieron con coeficientes de correlación bajos. Por todo ello, nuestros resultados sugieren que el aumento de la densidad de *A. cicada* se encuentra favorecida por el descenso de la T^{ar} , característica ecológica que hasta el momento no había sido bien documentada. Por último, *A. cicada* ha sido asociada a partir del modelo lineal de CT1 con elevado %SSVLM, coincidiendo con valores del IVF30 inferiores a 100 mL/g.

La relación de *A. cicada* con valores de CPT por encima de 15 g/Kg SSVLM.d a partir del modelo lineal de la matriz total FQAF sin categorizar sería consistente con los bajos valores de la EF y el TRHr asociados, así como con la baja relación DBO_5/PT observada a partir del modelo lineal de CT2. Dicha tendencia ha sido corroborada a partir del modelo unimodal de CX y matriz total FQAF, sin presentar valores extremos de las variables ambientales, y asociándose además en este último modelo al incremento de la CPT, CCarb, CProt y CN-NH_4^+ del afluente. Nuestras observaciones estarían de acuerdo con las elevadas tasas de crecimiento (r) descritas para *A. cicada* por Salvadó & Canals (2015), los cuales encuentran una elevada r máxima, indicando por tanto su relación con elevadas cargas orgánicas y elevadas tasas de división. Por todo ello, nuestros resultados sugieren que la mayor abundancia de *A. cicada* se encuentra influenciada por el incremento de la carga del afluente, especialmente de la CPT.

Los bajos rendimientos de la nitrificación asociados a la abundancia de *A. cicada* en el apartado anterior, podrían ser debidos a su relación con el descenso de la EF, T^{ar} y TRHr, e incremento de la carga del afluente. A pesar de ello, algunos autores han relacionado su aparición a estabilidad en el reactor biológico (Drakides, 1978; Curds, 1982; Madoni, 1991; García-González, 2003), así como al buen rendimiento de la depuración, encontrándose correlacionada con la DQO de salida (Salvadó *et al.*, 1988).

- **Euplotes affinis**

E. affinis se asocia con valores de la CM por encima de 0,16 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d a partir del modelo lineal de QB, así como valores de EF por debajo de 10 días a partir del modelo lineal de CX. La baja correlación observada de ambas variables a partir de la matriz total OPE probablemente sea debida a la ausencia de dicho organismo en CT1, CT2 y DN. Estos resultados han sido corroborados a partir del modelo unimodal de CX y de la matriz total OPE, asociándose en ambos con los valores más bajos de la EF, y más elevados de la CM en el caso de la matriz total. Nuestras observaciones estarían de acuerdo con los bajos coeficientes de correlación, pero significativos (análisis bivariado y PCA), encontrados por Madoni *et al.* (1993), entre *E. affinis* y la elevada carga del fango (0,05-0,4 g/g.d), así como los encontrados por Curds & Cockburn (1970b), los cuales observan densidades moderadas de esta especie en el intervalo de carga 0,19-0,45 g DBO₅/g SSLM.d. También coincidirían con las observaciones realizadas por Madoni (1988), que describen la mayor abundancia de este organismo en la fase de colonización del fango activo en las EDAR, puesto que en dichas fases son característicos valores bajos de la EF y elevados de la CM. El elevado coeficiente de correlación observado en el modelo de la matriz total OPE con baja concentración de SSLM podría estar de acuerdo con la elevada CM con la cual se ha asociado, teniendo en cuenta que valores bajos de SSLM pueden ocasionar efectos más severos en el sistema debido a sobrecargas orgánicas (por ejemplo vertidos). Estos resultados han sido corroborados a partir del modelo unimodal de la matriz FQLM, asociándose a los valores más bajos de SSLM. Además, en este mismo modelo los mayores valores del TRHds parecen haber contribuido a una mayor abundancia de *E. affinis*, lo que podría considerarse como un indicio de mayor tolerancia al déficit de OD. Por todo ello, nuestras observaciones sugieren a *E. affinis* como una especie bioindicadora de baja EF y elevada carga del afluente.

E. affinis también se ha relacionado con valores bajos de la T^ar (<20 °C) y elevados del NTLM a partir del modelo lineal y unimodal de CX, y en el caso del NTLM con los mayores valores a partir del modelo unimodal de la matriz total FQLM. Además, se ha mostrado también influenciado por baja T^ar y elevado %SSVLM a partir del modelo lineal y unimodal de la matriz total FQLM, así como a partir del modelo lineal de la matriz total sin categorizar variables. Por otro lado, la relación de *E. affinis* con la elevada CondLM de QB, es muy probable que se corresponda con la relación directa mantenida entre la CondLM y la CM en dicho biorreactor, cuyos valores podrían ser debidos a periodos de entrada de elevada carga en planta debido a posibles vertidos o sobrecargas orgánicas. Por todo ello, nuestras observaciones sugieren que *E. affinis* se encuentra muy influenciada por la T^ar, característica ecológica que hasta el momento no ha sido bien documentada.

La relación directa encontrada a partir del modelo lineal de QB con la CAG, tal cual se ha discutido anteriormente, podría ser atribuida a sobrecargas en planta, mientras que la encontrada con la CNI, podría dar indicios de cierta

resistencia al níquel. *E. affinis* ha sido relacionado con bajo %DQOs partir de la matriz total FQAF, siendo este dato poco consistente con la baja EF y alta CM asociadas. Dicha relación podría ser debida a la ausencia de *E. affinis* en DN, CT1 y CT2, siendo por ello baja la correlación del %DQOs respecto a los ejes canónicos extraídos en el modelo unimodal. A pesar de encontrar una baja correlación de *E. affinis* (probablemente por su ausencia en DN, CT1 y CT2) con elevada CPT a partir del modelo lineal de la matriz total FQAF y matriz total sin categorizar variables, el modelo unimodal de CX y matriz tota FQAF muestran un óptimo elevado de dicha variable. Además, en este último modelo se ha asociado con el incremento de la CCarb, CProt y CN-NH₄⁺ del afluente. Por todo ello, nuestros resultados sugieren que la mayor abundancia de *E. affinis* se encuentra influenciada con el incremento de la carga del afluente, especialmente de la CPT.

La relación principal entre *E. affinis* y elevada CM y CPT, así como baja EF y T^{ar}, estarían de acuerdo con la capacidad bioindicadora del bajo rendimiento de la nitrificación encontrada en el presente trabajo. Hasta el momento, y a excepción de Madoni (1988) y Madoni *et al.* (1993), no constan estudios concluyentes que relacionen *E. affinis* con las variables ambientales de EDAR a escala real, siendo la primera vez que se demuestra su relación a partir de rutinas estadísticas multivariantes de interpretación ambiental.

E. affinis y *A. cicada*, a pesar de ser considerados ciliados reptantes (Madoni, 2011), muestran diferente asociación al flóculo y diferentes hábitos de alimentación. Los cirros somáticos frontales y transversos muy desarrollados junto con la zona adoral de membranelas (ZAM) poco patente y situada en la mitad posterior del cuerpo, hacen que la capacidad de permanencia en el medio de *A. cicada* se limite a la capacidad de dicho organismo de reptar por la superficie del flóculo para alimentarse desprendiendo bacterias y partículas del mismo a través de los cirros. Contrariamente, *E. affinis* dispone de una abertura oral de gran tamaño con una ZAM muy desarrollada y un complejo paraoral, que lo hacen especialmente competitivo alimentándose de abundante crecimiento disperso, consecuencia de las cargas moderadas-altas del afluente. Por esta razón, es común observar a *E. affinis* capturando bacterias dispersas en el espacio interflocular junto con movimiento cortos, mientras que *A. cicada* se observa de forma frecuente alimentándose en la superficie flocular a través de su movimiento reptante. A partir de dichas características se deduce las mayores cargas asociadas de *E. affinis* respecto a *A. cicada*, especialmente a partir de los modelos unimodales.

Filofaríngeos

▪ *Gastronauta membranaceous*

G. membranaceous ha mostrado una correlación moderada-baja con elevados valores de la EF y ODm en CX y CT2, respectivamente, lo cual podría sugerir una dependencia del OD. Los modelos unimodales no mostraron valores óptimos extremos de las variables OPE, a excepción de la relación entre valores bajos del TRHr y elevados de la CO₃ en CT2.

La relación con la T^{ar} ha mostrado resultados contradictorios entre QB, CX y CT. En CX se demostró la relación de esta especie con elevada T^{ar} y bajo NTLM a partir del modelo lineal y unimodal, mientras que en QB la relación con la T^{ar} fue al contrario. Por otro lado, el biorreactor CT2 mostró una relación con baja T^{ar}, coincidiendo con valores elevados del IVF30, mientras que en QB la relación de *G. membranaceous* con la baja CondLM, relacionada directamente con la CM, podría corroborar la relación con la elevada EF en CX.

La relación con una baja CPT a partir del modelo lineal de CX y unimodal de CXCD sería consistente con la elevada EF asociada en CX, mientras que no explicaría la relación con el elevado %DQOs a partir del modelo lineal de CT2. En general, la baja correlación encontrada entre este organismo y la CM y EF en QB y CX, respectivamente, así como los resultados contradictorios en el caso de la T^{ar}, no aportan datos concluyentes sobre las asociaciones entre *G. membranaceous* y las variables ambientales de las EDAR estudiadas.

▪ *Trochilia minuta*

Los resultados encontrados a partir del modelo lineal de QB han revelado la influencia de la baja CM en *T. minuta*, siendo esta especialmente abundante por debajo de 0,16 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d. Estos resultados estarían de acuerdo con los encontrados por Salvadó & Gracia (1993), que observan una mayor abundancia de *T. minuta* en periodos con valores de CM inferiores a 0,1 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d. La influencia de la EF ha mostrado resultados contradictorios, asociándose con valores por debajo de 10 días en el modelo lineal de CX, y por encima en el caso de la matriz total OPE. Por otro lado, esta especie se ha asociado con valores bajos de la EF a partir del modelo unimodal de CX, mientras que a partir del modelo unimodal de la matriz total OPE lo hace con valores cercanos a la media (origen de coordenadas). Estos resultados contradictorios podrían deberse a las diferencias de densidad absoluta existentes principalmente entre CX y DN, siendo la EF y densidad mucho mayor en este último biorreactor. Salvadó (1994) determinó las mayores densidades de población de *T. minuta* en el rango de EF (θ_b) de 6-10, 10-15 y 15-30 días. A pesar de las discrepancias encontradas entre CX y el resto de biorreactores, nuestros resultados sugieren que probablemente bajas cargas y elevados valores de la EF influyan sobre la abundancia de *T. minuta*.

La relación de *T. minuta* con baja CondLM a partir del modelo lineal de QB estaría de acuerdo con la asociación directa de esta variable con la CM de dicho biorreactor, y además consistente con la elevada EF asociada. Por otro lado, la densidad de *T. minuta* se ha mostrado claramente influida por la T^a_r (por debajo de 20 °C) a partir de los modelos lineales de QB, CX, matriz total FQLM y matriz total de variables sin categorizar. Estos resultados han sido corroborados a partir de los modelos unimodales de CX y matriz total FQLM, relacionando dicho organismo también con valores bajos de T^a_r . Por todo ello, nuestros resultados sobre la influencia de la baja T^a_r en *T. minuta* son concluyentes, siendo la primera vez que se documenta la influencia de dicha variable.

La correlación moderada-baja observada entre esta especie y valores bajos de la CAG a partir del modelo lineal de QB, así como su relación con valores bajos del %DQOs (<40%) en CT2 y matriz total FQAF indicarían indirectamente una relación con la baja CM asociada en QB. Por otro lado, la asociación encontrada con elevada CPT a partir del modelo lineal y unimodal de CX sería consistente con la baja EF en ese mismo reactor, encontrándose una relación negativa con la alta EF y baja CPT asociada a partir de la matriz total OPE y FQAF, respectivamente. Nuestras observaciones estarían de acuerdo con las bajas tasas de crecimiento (r) descritas para *T. minuta* por Salvadó & Canals (2015), los cuales indican una baja r máxima y, por lo tanto, su relación con bajas cargas orgánicas y bajas tasas de división. Las especies que alcanzan valores superiores de r son aquellas de pequeño tamaño (Fenchel, 1987). Una de las excepciones a dicha regla sería *T. minuta*, que es uno de los ciliados más pequeños encontrados en fangos activos, y que muestra una r más bien baja.

Nuestros resultados parecen indicar que *T. minuta* se encontraría muy influenciada por bajas cargas orgánicas y altos valores de la EF, principalmente a baja T^a_r , lo que supondría su capacidad bioindicadora de buenos rendimientos del proceso de nitrificación como se propone en el apartado anterior. Las asociaciones contrarias observadas en CX podrían ser debidas a la influencia de otra variable ambiental o biológica no contemplada en el presente trabajo. Dubber & Gray (2011a) sugieren que, debido a que *T. minuta* se encuentra asociada al flóculo, la ocurrencia de dicho organismo podría relacionarse con la compactación y forma de los flóculos, observando que las mayores densidades se corresponden con flóculos firmes, redondeados y compactos. Las abundancias de *T. minuta* obtenidas en el presente trabajo han sido mayores que las obtenidas por dichos autores. Nuestros resultados de abundancia concuerdan con las de otros trabajos (Zornoza *et al.*, 2008) y discrepan sobre la relación entre esta especie y la estructura flocular propuesta por Dubber & Gray (2011a). En nuestro caso en la EDAR DN, las mayores densidades de población han aparecido con estructuras floculares abiertas y una presencia significativa de poblaciones de bacterias filamentosas. Algunos autores señalan que *T. minuta* se alimenta preferentemente de bacterias filamentosas (Pauli *et al.*, 2001; Serrano *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2008;), encontrando algunos de ellos densidades de población inusualmente elevadas durante periodos de *bulking* filamentoso (Zornoza *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009). La revisión sobre la presencia de morfotipos filamentosos en la EDAR DN, coincidentes con las mayores densidades de

población de *T. minuta*, nos ha permitido observar que su incremento se produjo en algunos muestreos con el aumento de *Microthrix parvicella*. Por otro lado, una posible explicación del ligero aumento de *T. minuta* en la EDAR CX podría ser debido al aumento de la población de *Nostocoida limicola* y el tipo 0092. Estas observaciones deben de ser tomadas como meramente descriptivas, siendo necesario el empleo de análisis multivariantes de interpretación ambiental que relacionen ambos conjuntos de variables biológicas para llegar a alcanzar conclusiones más firmes. En base a lo indicado, sugerimos que probablemente la capacidad de permanencia de *T. minuta* podría depender de la abundancia de bacterias filamentosas y/o presencia de estructuras floculares abiertas, que le permitan acceder fácilmente a las bacterias filamentosas. En este sentido, la asociación descrita en el presente trabajo con algunas de las variables ambientales, podría considerarse como una relación indirecta basada en aquellas variables ambientales que podrían desencadenar estructuras abiertas en el flóculo y determinados crecimientos filamentosos. Algunos trabajos han determinado una elevada sensibilidad de *T. minuta* a metales pesados (Madoni, 1996).

Hasta el momento los estudios que relacionen *T. minuta* con las variables ambientales de EDAR a escala real no han sido concluyentes, siendo la primera vez que se relaciona a partir de rutinas estadísticas multivariantes de interpretación ambiental.

- ***Pseudochilodonopsis fluviatilis***

Los resultados de los modelos lineales de los biorreactores de la EDAR CX y matriz total OPE indican que dicho organismo está relacionado con valores de EF por encima de 10 días. La correlación inversa encontrada entre *P. fluviatilis* y la EF en DN, asociándose a valores por debajo de 20 días, sugiere que su rango óptimo de EF probablemente se encuentre entre 10 y 20 días. Los datos contradictorios que relacionan *P. fluviatilis* con baja EF en CT2 no han sido considerados relevantes, debido a su moderada-baja correlación y su menor densidad absoluta. Además, los resultados de los modelos unimodales de CX y matriz total OPE han permitido corroborar los encontrados en los modelos lineales, indicando su relación con el incremento de la EF (aunque cercano al origen de coordenadas), y con la disminución de la CM en el caso de la matriz total OPE. Por otro lado, el modelo lineal de QB ha permitido demostrar que la densidad de *P. fluviatilis* se encuentra influida por baja CM, principalmente por debajo de 0,16 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d, resultados que serían consistentes con el elevado TRHr asociado a partir del modelo lineal y unimodal, así como en el unimodal de la matriz total OPE. Por todo ello, nuestras observaciones sugieren que *P. fluviatilis* es un bioindicador de elevada EF, siendo la primera vez que se demuestra a partir de modelos de interpretación ambiental.

La relación moderada-baja encontrada de *P. fluviatilis* con bajos valores de la CondLM a partir del modelo lineal de QB, CT2 y unimodal de la matriz total FQLM, probablemente se corresponda con la relación directa de dicha variable con la CM, resultados que estarían de acuerdo con la baja CM asociada en QB. Por otro lado, *P. fluviatilis* se

ha asociado a valores bajos de la T^a_r a partir del modelo lineal de QB, CX, CT2 (junto con elevado IVF30), así como a partir del modelo unimodal de CX (junto con bajo NTLM) y matriz total FQLM. Por todo ello, nuestros resultados sugieren que *P. fluviatilis* se encuentra muy condicionada por la T^a_r , siendo probablemente la primera vez que se le atribuye dicha característica ecológica.

La relación de *P. fluviatilis* con valores de CPT inferiores a 15 g/Kg SSVLM.d, observada a partir del modelo lineal de CXCD y matriz total sin categorizar variables, sería consistente con la elevada EF, TRHr y baja CM que se asocian significativamente a esta especie. Estos mismos resultados han sido corroborados a partir del modelo unimodal de CX y matriz total FQAF, asociándose en este último modelo, además, a la disminución de la CCarb, CProt y CN-NH₄⁺ del afluente. Este organismo se ha asociado también a bajos valores de la CAG a partir del modelo unimodal de QB. Por otro lado, los resultados del modelo unimodal de CT1 que relacionan *P. fluviatilis* con valores del %DQOs inferiores al 40% (rango 15-62%), relación que ha sido corroborada a partir de su modelo unimodal, podrían estar indirectamente relacionados con la baja carga en el proceso. Por todo ello, nuestras observaciones señalan a *P. fluviatilis* como un excelente bioindicador de baja carga en el afluente, especialmente de la CPT.

La capacidad bioindicadora del buen rendimiento de la nitrificación de *P. fluviatilis*, discutido en el apartado anterior, estaría justificada por la influencia de la elevada T^a_r , EF y TRHr, así como la baja carga del afluente. Debido a la similitud biológica con *Chilodonella uncinata*, de la que se distingue por la cinetia preoral fragmentada (Foissner *et al.*, 1996), es muy probable que esta especie haya sido confundida o incluso obviada en algunos seguimientos de plantas depuradoras (Becarés, 1991, 1994). Hasta el momento, no constan estudios concluyentes que relacionen *P. fluviatilis* con las variables ambientales de EDAR a escala real, siendo la primera vez que se demuestra su relación a partir de rutinas estadísticas multivariantes de interpretación ambiental.

Suctores

▪ *Acineta tuberosa*

La asociación de *A. tuberosa* con una elevada EF ha sido claramente observada a partir de los modelos lineales de CX y matriz total OPE, por encima aproximadamente de 10 días, y de DN, por encima de 20 días. Estos resultados indicarían que *A. tuberosa* podría encontrarse en un amplio rango de EF, por encima de 20 días. Los modelos unimodales han corroborado dicha relación con valores extremos en el gradiente de la EF, tanto en CX como en la matriz total OPE. Por ello, proponemos que *A. tuberosa* es una especie bioindicadora de elevados valores de la EF, siendo la primera vez que se demuestra a partir de modelos de interpretación ambiental.

La elevada T^a_r parece mostrarse como un factor determinante en la abundancia de *A. tuberosa*, a partir de los modelos lineales de CT1, CT2 (junto con bajo IVF30), CX y matriz total FQLM, por encima aproximadamente de 20 °C.

Dicha relación se ha corroborado a partir del modelo unimodal de CX y matriz total FQLM, junto con niveles bajos del NTLM y %SSVLM. Por todo ello, nuestros resultados indican que *P. fluviatilis* se encuentra muy influenciada por la T^ar, siendo probablemente la primera vez que se le atribuye dicha característica ecológica en fangos activos.

La relación encontrada de *A. tuberosa* con elevada CNi a partir del modelo lineal de QB, podrían sugerir cierta tolerancia al níquel. Por otro lado, la relación encontrada con baja CPT a partir de los modelos lineales de CXCD, matriz total FQAF y matriz total de variables sin categorizar, por debajo aproximadamente de 15 g/Kg SSVLM.d, la asocian con cargas débiles del afluente. Estos mismos resultados se corroboran a partir del modelo unimodal de CX y matriz total FQAF, asociándose en este último también con la disminución de la CCarb, CProt y CN-NH₄⁺ del afluente. Dichas asociaciones estarían de acuerdo indirectamente con la relación encontrada con bajo %DQOs a partir del modelo lineal y unimodal de CT2, por debajo del 40%. Por todo ello, nuestros resultados sugieren que *A. tuberosa* es un excelente bioindicador de baja carga en el afluente, especialmente de la CPT. Dichas observaciones estarían de acuerdo con la mayor densidad de población encontrada de *A. tuberosa* en el intervalo de CM de 0,03-0,1 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d descrito por Salvadó & Gracia (1993). Por otro lado, también estarían de acuerdo con las bajas tasas de crecimiento (r) descritas para *A. tuberosa* referidas por Salvadó & Canals (2015), los cuales encuentran baja r máxima, indicando por tanto su relación con bajas cargas orgánicas y bajas tasas de división.

La influencia de alta EF, baja carga del afluente y elevada T^ar estarían de acuerdo con su excelente capacidad bioindicadora de elevados rendimientos del proceso de nitrificación, discutida en el apartado anterior. A pesar de encontrarse algunos estudios que relacionan *A. tuberosa* con buenos rendimientos del proceso biológico (Salvadó *et al.*, 1995; Jaromin-Glen *et al.*, 2013), no constan trabajos concluyentes que relacionen dicho organismo con variables ambientales, siendo la primera vez que se le atribuyen dichas características ecológicas a partir de rutinas estadísticas multivariantes de interpretación ambiental.

▪ *Periacineta* sp.

Los resultados sobre la influencia de las variables ambientales en la dinámica poblacional de *Periacineta* sp. han sido muy similares a los encontrados para *A. tuberosa*. Nuestros resultados sugieren que *Periacineta* sp. se encuentra influenciada por valores de EF por encima de 10 días, como *Multifasciculatum elegans*, a partir del modelo lineal y unimodal de CX. Por otro lado, esta especie también se ha asociado con una elevada EF, aunque en este caso con un coeficiente de correlación bajo, a partir del modelo lineal de CT2. Por último, su asociación con bajo ODM en este mismo reactor carece de especial relevancia a falta de más datos que corroboren dicha influencia.

La elevada T^ar y bajo NTLM parecen mostrar una influencia en el desarrollo de *Periacineta* sp., junto con *M. elegans*, a partir del modelo lineal y unimodal de CX. Además, a partir de la matriz total FQLM también ha sido posible

asociar dicho organismo con elevada $T^a r$ y baja ConLM, que en este último caso podría ser consistente con la elevada EF asociada.

Los resultados sobre la influencia de las variables FQAF han demostrado que *Periacineta* sp., junto con *M. elegans*, se encuentran muy relacionados con bajas CPT, a partir del modelo lineal y unimodal de CX. Además, estos mismos resultados han sido también corroborados a partir del modelo unimodal de la matriz total FQAF, asociándose en este último también con la disminución de la CCarb, CProt y CN-NH₄⁺ del afluente. Por otro lado, la relación inversa encontrada con el %DQOs, sería consistente con dichas observaciones y con los valores elevados de EF asociados.

A partir de nuestras observaciones sobre la influencia de alta EF, baja carga del afluente y elevada $T^a r$ en el desarrollo de *Periacineta* sp., sería un buen indicador de elevados rendimientos del proceso de nitrificación.

▪ *Tokophrya infusioinum*

A pesar de la baja densidad absoluta observada para *Tokophrya infusioinum* respecto a *Periacineta* sp. y *A. tuberosa*, merece especial interés discutir la influencia observada de las variables ambientales de estos dos últimos taxones respecto a *T. infusioinum*.

T. infusioinum se muestra influida por bajos valores del TRHr a partir del modelo lineal de CT1, mientras que con bajos valores de la EF lo ha hecho a partir del modelo lineal de CT2 y matriz total OPE. Dichos resultados, junto con su relación con valores elevados de SSLM, CM, y CMDQOs, han podido ser corroborados a partir del modelo unimodal de CT1 y matriz total OPE.

La influencia de las variables FQLM no han mostrado resultados concluyentes, mientras que las variables FQAF lo han hecho exclusivamente a partir de los modelos unimodales. En este caso, los resultados de los modelos unimodales de CT1 y matriz total FQAF parecen revelar una relación de *T. infusioinum* con valores elevados de la CPT, %DQOs, CCarb, CProt y CN-NH₄⁺, y baja de la relación DBO₅/PT del afluente. Dichos resultados serían consistentes con las variables OPE asociadas anteriormente. Nuestras observaciones estarían de acuerdo con las elevadas tasas de crecimiento (r) descritas para *T. infusioinum* por Salvadó & Canals (2015), los cuales encuentran una elevada r máxima, indicando por tanto su relación con elevadas cargas orgánicas y elevadas tasas de división, contrariamente a la r máxima de *A. tuberosa*. Nuestros resultados sugieren que *T. infusioinum* podría considerarse como bioindicador del incremento de carga afluente y baja EF.

Escuticociliados

- *Uronema nigricans*

Uronema nigricans ha sido relacionado en el modelo lineal de QB con elevado TRHds, principalmente por encima de 6 horas. Dicha relación, observada en el biorreactor con mayor variabilidad del TRHds, proporcionaría indicios de una mayor tolerancia a las condiciones anóxicas/anaerobias ocurridas cuando aumenta el TRH en el clarificador secundario, y por lo tanto, mayor resistencia a la limitación del OD. Por otro lado, valores por encima de 10 días de EF a partir del modelo lineal de CX provocan una mayor abundancia de *U. nigricans*. Estos resultados serían contradictorios con la elevada carga y baja EF asociadas por Madoni (1988) a esta especie, así como la relación con una elevada concentración de la DQO y amonio del afluente asociados por Puigagut *et al.* (2009). Por último, los resultados de la abundancia de *U. nigricans* a partir del modelo lineal y unimodal de CT1 y matriz total OPE darían indicios de cierta resistencia al ozono.

U. nigricans parece encontrarse influenciado por valores elevados de la T^a r y bajos del NTLM a partir del modelo lineal de CX, mientras que los resultados han sido contrarios en el caso del modelo de CT1 y CT2 (junto con elevada CondLM).

La relación con baja CPT a partir del modelo lineal de CX sería consistente con los valores de EF asociados en el mismo biorreactor, pero contrarios indirectamente con el elevado %DQOs asociado a partir del modelo lineal de CT2.

En conclusión, los resultados no son significativos, incluso han mostrado ser contradictorios a los observados en diferentes estudios, debido probablemente a la baja densidad absoluta de *U. nigricans* comparada con la encontrada por Salvadó & Gracia (1993), Salvadó *et al.* (1995) y Puigagut *et al.* (2009).

A pesar de encontrarse algunos estudios que relacionan *U. nigricans* con una elevada concentración de la DBO₅ del efluente (Salvadó *et al.*, 1995) y buen rendimiento de la DQO (Pérez-Uz *et al.*, 2010), son escasos aquellos que lo hacen directamente con las variables ambientales (Madoni, 1988, 1993; Puigagut *et al.*, 2009). Los resultados del estudio de Salvadó & Canals (2015) han permitido describir elevadas tasas de crecimiento (r) para *U. nigricans*, encontrando la r máxima más elevada, indicando por tanto su relación con elevadas cargas orgánicas y elevadas tasas de división.

Peritricos

▪ *Carchesium polypinum*

Respecto a la influencia de las variables OPE, no se han observado relaciones significativas con este organismo. La relación con elevados valores del TRHr en CT1 no se ha considerado relevante debido a la baja densidad absoluta observada en dicho reactor. No obstante, esta tendencia estaría de acuerdo con la relación observada (PCA, análisis biariado y RDA) entre la abundancia de *C. polypinum* y un elevado TRHr, referido al rango 10,5-21,3 y 10,3-17,6 horas, por Hu *et al.* (2013a, b). Por otro lado, la relación observada con bajos valores de la EF y altos de la CM a partir del modelo unimodal de la matriz total OPE no se ha considerado por la ausencia de relación significativa a partir del correspondiente modelo lineal. No obstante, la tendencia parece ser consistente con la frecuencia de aparición moderada y abundante encontrada en el rango 0,18-0,45 g DBO₅/g SSLM.d por Curds & Cockburn (1970b), aunque las mayores abundancias corresponden al rango 0,19-0,25 g DBO₅/g SSLM.d. Estos últimos resultados parecen mostrar cierta contradicción con las observaciones de Salvadó (1994), encontrando las mayores densidades a partir de valores de EF (θ_b) superiores a 10 días, y Salvadó & Gracia (1993), que encuentran las mayores densidades respecto a la CM en el intervalo 0,03-0,1 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d. Aunque las elevadas densidades de población de *C. polypinum* observadas por estos últimos autores no son concluyentes, sería interesante continuar estudiando la influencia de las variables OPE en su dinámica poblacional.

Valores de T^ar inferiores a 20 °C influyen sobre las poblaciones de *C. polypinum*, según los resultados de los modelos lineales en QB, CT2 (coincidiendo con elevado IVF30) y la matriz total de variables sin categorizar (coincidiendo con elevado %SSVLM). Hu *et al.* (2013a, b) y Chen *et al.* (2014) revelan una relación (PCA, RDA y análisis bivariado) entre densidades medias de *C. polypinum* y la baja T^ar (referida al rango 14,5-26,3 °C), lo cual concuerda con nuestros resultados. Esta especie también se asocia con elevado IVF (referido al rango 45-256 y 50-310 mL/g) y %SSVLM (68 ± 8 y $67 \pm 10\%$) según Hu *et al.* (2013a, b).

Respecto a la influencia de las variables FQAF, tan solo se ha observado relación con un elevado %DQOs (superior al 40%) a partir del modelo lineal y unimodal de CT2, asociación que podría explicarse por la elevada CM asociada a partir del modelo unimodal de la matriz total OPE.

En resumen, los resultados obtenidos no han revelado relaciones significativas de esta especie con los parámetros considerados, presentando baja densidad en todo el periodo de muestreo. A pesar de encontrarse algunos estudios que asocian *Carchesium* sp. con concentraciones de 1 ppm de fenol en SBR piloto (Papadimitriu *et al.*, 2013), así como la especie *C. polypinum* con un buen rendimiento de eliminación de SST, DQO y DBO₅ en el efluente (Hu *et al.*,

2013b), son escasos aquellos que lo hacen directamente con variables ambientales (Curds & Cockburn, 1970b; Salvadó & Gracia, 1993, Salvadó, 1994; Lee *et al.*, 2004, Hu *et al.*, 2013a, b).

- ***Epistylis balatonica***

Foissner *et al.* (1992) considera que *Epistylis balatonica* y *Epistylis chrysemidis* constituyen una única especie. Ambas son morfológicamente muy similares, si bien la variedad *E. balatonica* es más pequeña y epibiótica, apareciendo comúnmente sobre el pedúnculo de otros ciliados peritricos. En este trabajo se han considerado ambas variedades por separado con el objetivo de revelar posibles diferencias o semejanzas en su relación con las variables ambientales.

E. balatonica ha sido relacionada con elevada EF a partir del modelo lineal de CX, por encima aproximadamente de 10 días, y de DN, por encima de 20 días. Sin embargo, los resultados de los modelos unimodales de CX y matriz total OPE no la relacionan con valores elevados de la EF, por lo que los resultados no son concluyentes.

La T^r por encima de 20 °C ha influido en la mayor abundancia de este organismo en CX, tanto a partir del modelo lineal como del unimodal, mientras que la relación a partir del modelo lineal de CT2 ha sido contraria, junto con el aumento de la CondLM. De la misma forma que para la EF, no se han obtenido resultados concluyentes respecto a una relación significativa de la T^r en *E. balatonica*.

Respecto a las variables FQAF, se ha encontrado relación con baja CPT en CXAB, resultado que podría no concordar con la baja relación DBO₅/PT encontrada a partir del modelo lineal de CT2. En el caso de ambas variables, tampoco ha sido posible encontrar relaciones significativas a partir del resto de modelos. Hasta el momento, no consta en la bibliografía ninguna referencia al valor bioindicador de *E. balatonica* respecto a las variables ambientales de planta. Sin embargo, Pérez-Uz *et al.* (2010) han relacionado (PCA) *E. balatonica* con buenos rendimientos de eliminación de la DQO.

- ***Epistylis chrysemidis***

Respecto a su relación con las variables OPE, tan solo se ha encontrado relación con elevados valores del TRHr a partir del modelo lineal y unimodal de CT1, y por ello, probablemente podría estar asociada de forma indirecta con baja carga orgánica en el afluente.

E. chrysemidis se ha relacionado con bajos valores del pHLM a partir del modelo lineal de QB y elevados valores de la CondLM a partir del modelo unimodal de CX. El estrecho rango del pHLM en el primer caso y la baja densidad absoluta de organismos en el biorreactor CX no han permitido obtener resultados concluyentes.

La relación de *E. chrysemidis* con baja CAG y %DQOs, asociadas a partir del modelo lineal de QB y unimodal de CT1, respectivamente, la relacionarían indirectamente con la baja carga orgánica del afluente.

Aunque parece que *E. chrysemidis* tiende a asociarse de forma indirecta con baja carga orgánica del afluente, los resultados no son lo suficientemente concluyentes, lo cual concuerda con los resultados previos en estudios de bioindicación en los que no se han encontrado relaciones de *Epistylis chrysemidis* con variables ambientales en EDAR.

- ***Epistylis plicatilis***

Los resultados encontrados a partir de los modelos lineales de CX y matriz total OPE indican que *E. plicatilis* se asocia a valores de EF aproximadamente por encima de 10 días. Los resultados del modelo unimodal de la matriz total OPE serían consistentes con la baja EF asociada, puesto que dicho organismo se encuentra influido por la baja CMDQOs y elevado TRHr, condiciones que representan cargas débiles en el reactor biológico. Nuestras observaciones estarían de acuerdo con la tendencia al incremento de la densidad de *E. plicatilis* a partir de 10 días de EF (θ_b) encontrada por Salvadó (1994). Además, estos mismos resultados estarían de acuerdo con el mayor promedio de abundancia de *E. plicatilis* encontrado en el intervalo de CM de 0,1-0,2 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d por Salvadó & Gracia (1993), así como los encontrados por Curds & Cockburn (1970b), los cuales observan esta especie de forma abundante y moderada en el rango 0,12-0,22 g DBO₅/g SSLM.d. La ausencia de relación significativa con alta EF a partir del modelo unimodal de la matriz total OPE respecto a la relación significativa encontrada a partir del modelo unimodal de CX probablemente sea debido a otros factores. Por todo ello, nuestros resultados sugieren a *E. plicatilis* como bioindicador de una EF elevada. Por otro lado, *E. plicatilis* también ha sido asociada a partir del modelo unimodal de la matriz total OPE con elevado TRHds, lo cual podría ser un indicio de resistencia a condiciones anóxicas/anaerobias, así como baja concentración de SSLM. Esta última asociación estaría de acuerdo con el coeficiente de correlación significativo moderado-bajo (análisis bivariado) encontrado entre *E. plicatilis* y la baja concentración de SSLM (Hu *et al.*, 2013b).

Se ha encontrado influencia de valores de T^{ar} superiores a 20 °C (coincidiendo con bajo NTLM) sobre *E. plicatilis* a partir del modelo lineal y unimodal de CX, mientras que a partir del modelo lineal de la matriz total FQLM ha mostrado una moderada-baja correlación con la T^{ar} en el dbRDA3, cuyo eje mostró una baja variación explicada. Además, a partir del modelo unimodal de esta última matriz se ha relacionado con elevada T^{ar}, %SSVLM y NTLM. En parte, estos resultados estarían de acuerdo con la relación (PCA y análisis bivariado) descrita por Hu *et al.* (2013a, b) entre *E. plicatilis* y un valor elevado del %SSVLM, aunque contradice la relación inversa con la T^{ar}. Estos autores la asocian además con elevado IVF, referido al rango 45-310 mL/g, considerándolo incluso como organismo bioindicador del *bulking* filamentoso (Hu *et al.*, 2013a). En resumen, aunque *E. plicatilis* parece mostrar una influencia por elevados valores de la T^{ar}, consideramos necesarios resultados más concluyentes.

La relación encontrada con baja CPT a partir de los modelos lineales de CXCD, matriz total FQAF y matriz total de variables sin categorizar, por debajo aproximadamente de 15 g/Kg SSVLM.d, lo asocian con cargas débiles. Estos mismos resultados han sido corroborados a partir del modelo unimodal de CX y matriz total FQAF, asociándose además en este último modelo con la disminución de la CCarb, CProt y CN-NH₄⁺ del afluente. La asociación con el incremento de la relación DBO₅/PT a partir del modelo unimodal de la matriz total FQLM sería consistente con la baja CPT asociada. Nuestros resultados no parecen corroborar las elevadas tasas de crecimiento (r) descritas para *E. plicatilis* por Salvadó & Canals (2015), los cuales encuentran elevada r máxima, indicando por tanto su relación con elevadas cargas orgánicas y elevadas tasas de división. Por todo ello, nuestras observaciones sugieren a *E. plicatilis* como una excelente especie bioindicadora de baja carga en el afluente, especialmente de la CPT.

La influencia de la alta EF y baja carga del afluente justificarían su capacidad bioindicadora de buenos rendimientos del proceso de nitrificación, discutida en el apartado anterior. A pesar de encontrarse algunos estudios que relacionan *E. plicatilis* con buenos rendimientos de eliminación de SST, DQO y DBO₅ (Hu *et al.*, 2013b), los trabajos que relacionan dicho organismos con variables ambientales han sido hasta la fecha más bien escasos (Hu *et al.*, 2013a, b), siendo más completos los obtenidos en el presente trabajo.

▪ *Opercularia articulata*

Los resultados encontrados a partir de los modelos lineales de CX, CT2 y matriz total OPE indican que la abundancia de *O. articulata* se encuentra influenciada por valores de EF superiores a 10 días. Además, los modelos unimodales de CX y matriz total OPE la han relacionado también con alta EF y baja carga del afluente (CMDQOs y CM). Por otro lado, la relación observada con elevado TRHr a partir del modelo lineal y unimodal de CT1 sería consistente con la elevada EF y baja carga afluente asociadas. En base a nuestros resultados, consideramos que *O. articulata* es un excelente bioindicador de elevada EF, siendo la primera vez que se demuestra a partir de modelos estadísticos de interpretación ambiental.

O. articulata ha sido relacionada con valores de T^ar por encima de 20 °C a partir del modelo lineal de CX, CT2 y matriz total FQLM, mientras que en QB los resultados han sido diferentes. Estos últimos no han sido considerados relevantes debido a la correlación moderada-baja observada con la T^ar en el dbRDA2, el cual explica el 6,04% de la variación total de organismos, mientras que los correspondientes a CX, CT2 y matriz total FQLM (dbRDA1) han explicado el 40,94%, 14,79% y 13,16%, respectivamente. Además, estos resultados han sido corroborados a partir del modelo unimodal de CX y matriz total FQLM. Por todo ello, nuestros resultados evidencian una clara influencia de la T^ar en la dinámica poblacional de *O. articulata*. Por otro lado, se ha relacionado a partir del modelo lineal y unimodal de CX, junto a la T^ar, con bajo NTLM. La relación con el IVF30 han sido inversa en los biorreactores de la EDAR CT, mientras que en CT1 se relaciona con elevado IVF30 en periodos de bajo %SSVLM, en CT2 lo hace

con valores bajos del IVF30 en periodos de alta T^a_r . Estos resultados contradictorios no han sido considerados relevantes debido al estrecho rango del IVF30 observado en ambos biorreactores. Por último, *O. articulata* se ha relacionado, a partir del modelo lineal de CT2 y la matriz total FQLM, con bajo %SSVLM, probablemente debido al efecto de la alta T^a_r ya discutido anteriormente.

Respecto a las variables FQAF, *O. articulata* resultó influida por la baja CPT, por debajo de 15 g/Kg SSVLM.d, a partir de los modelos lineales de CXCD, matriz total FQAF y matriz total de variables sin categorizar. Estos mismos resultados han sido corroborados a partir del modelo unimodal de CX y matriz total FQAF, asociándose en este último modelo además con la disminución de la CCarb, CProt y CN-NH₄⁺ del afluente. Estos resultados serían consistentes con el bajo %DQOs asociado a partir del modelo unimodal de CT1 y con la elevada relación DBO₅/PT correspondiente al modelo lineal de CT2. Nuestros resultados estarían de acuerdo con las bajas tasas de crecimiento (r) descritas para *O. articulata* por Salvadó & Canals (2015), los cuales encuentran valores bajos para la r máxima más probable, indicando por tanto su relación con bajas cargas orgánicas y bajas tasas de división. Por todo ello, nuestras observaciones sugieren que *O. articulata* es un excelente bioindicador de baja carga en el afluente, especialmente de la CPT, siendo la primera vez que se demuestra a partir de modelos de interpretación ambiental.

La influencia de la alta EF y elevada T^a_r , así como la baja carga del afluente, estarían de acuerdo con su capacidad bioindicadora de buenos rendimientos del proceso de nitrificación, discutida en el apartado anterior. Hasta el momento, no constan trabajos publicados que relacionen directamente *O. articulata* con las variables ambientales en EDAR a escala real, siendo el presente trabajo el primero que aporta una descripción detallada de sus características ecológicas en fangos activos. Destaca las aportaciones de algunos autores que determinan en ensayos de laboratorio la tolerancia de *O. articulata* a choques de carga de cloruro sódico (hasta dosis de 20 g/L) (Salvadó *et al.*, 2001).

▪ *Opercularia coarctata*

El modelo lineal de CX ha permitido revelar la influencia sobre *O. coarctata* de los valores de EF inferiores a 10 días, mientras que los resultados del modelo lineal y unimodal de la matriz total OPE indican que dicho peritrico se encuentra favorecido por concentraciones bajas de SSLM. Estos resultados estarían de acuerdo con el estudio descriptivo realizado por Poole (1984), en el que se relaciona *O. coarctata* con baja concentración de SSLM (2 g/L), así como con la alta CM y CMDQOs, baja concentración de SSLM y valores muy bajos de EF y TRHr, tal y como se ha demostrado a partir de los modelos unimodales. Nuestros resultados estarían de acuerdo con la mayor abundancia de *O. coarctata* observada en el intervalo de CM de 0,3-0,4 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d por Salvadó & Gracia (1993), así como la frecuencia de aparición moderada y abundante encontrada en el rango 0,15-0,55 g DBO₅/g SSLM.d por Curds & Cockburn (1970b), aunque la mayor frecuencia corresponde al rango 0,19-0,39 g DBO₅/g SSLM.d. Además, también estarían de acuerdo con el estudio realizado por Drzewicki & Kulikowska (2011) en una

EDAR con entrada temporal de agua residual procedente de tanques sépticos, en el cual relacionan (análisis bivariado) el incremento de *O. coarctata* con una elevada concentración de la DQO (2342 ± 647 mg/L), DBO₅ (1582 ± 452 mg/L) y nitrógeno amoniacal ($162,4 \pm 8,1$ mg/L) en el afluente, y por tanto, con la desestabilización del proceso. Por otro lado, esta especie se ha asociado con elevados valores del TRHds a partir del modelo unimodal de la matriz total OPE, lo que podría indicar una mayor tolerancia al déficit de OD. Estos resultados estarían de acuerdo con la relación encontrada por Madoni *et al.* (1993) entre *Opercularia* sp. (*O. microdiscum* y *O. coarctata*) y bajos valores de OD y TRHr, y la encontrada por Madoni (1994b) entre *Opercularia* sp. (*O. microdiscum*, *O. coarctata* y *O. mínima*) y bajo OD. Por todo ello, nuestras observaciones sugieren a *O. coarctata* como una especie bioindicadora de baja EF y elevada carga del afluente.

O. coarctata se ha relacionado con valores de T^ar inferiores a 20 °C a partir del modelo lineal de CX y matriz total de variables sin categorizar, asociándose con elevado NTLM en el primer modelo y alto %SSVLM en el segundo, siendo variables mutuamente relacionadas, como se ha discutido anteriormente. Estos resultados han podido ser corroborados a partir del modelo unimodal de CX y la matriz total FQLM. Por todo ello, nuestras observaciones evidencian una clara relación de esta especie con baja T^ar.

O. coarctata se asocia con valores de CPT superiores a 15 g/Kg SSVLM.d a partir del modelo lineal de CX, matriz total FQAF y matriz total de variables sin categorizar. Además, estos resultados han sido corroborados a partir del modelo unimodal de CX y matriz total FQAF, en este último también se relaciona con los valores más elevados de CN-NH₄⁺, CCarb y CProt, lo que corroboraría los resultados encontrados por Drzewicki & Kulikowska (2011) y Salvadó & Canals (2015), que establecen elevadas tasas de crecimiento (r) para *O. coarctata* y la relacionan con elevadas cargas orgánicas y elevadas tasas de división. Por todo ello, nuestras observaciones indican que *O. coarctata* es un excelente bioindicador de elevada carga del afluente, especialmente de la CPT. La asociación observada con elevada relación DBO₅/PT a partir del modelo lineal de la matriz FQAF podría ser consistente con la elevada carga orgánica asociada. Por otro lado, *O. coarctata* ha sido relacionada con bajo %DQOs a partir del modelo unimodal de la matriz total FQAF, siendo poco consistente con la baja EF y alta CM asociadas. No obstante, dicha relación se considera poco relevante debido a la baja correlación del %DQOs respecto a los ejes canónicos extraídos en el modelo unimodal.

A pesar de encontrar una abundancia moderada-baja de *O. coarctata* en el presente trabajo, esta ha mostrado una clara influencia de valores muy elevados de carga orgánica en el afluente y bajos de la EF y T^ar. Estos resultados estarían de acuerdo con su excelente capacidad bioindicadora del proceso de nitrificación discutida en el apartado anterior, siendo la especie que indica peores rendimientos de eliminación del nitrógeno. Los valores de dichas variables ambientales son susceptibles de comprometer la calidad del efluente tratado, observaciones que han sido

documentadas por numerosos autores (Curds, 1975; Poole, 1984; Madoni *et al.*, 1993; Madoni, 1994b; Salvadó *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 2006). Algunos autores han asociado *O. coarctata* a plantas depuradoras que tratan aguas residuales industriales (Becarés, 1991) con elevada tolerancia a metales pesados (Madoni *et al.*, 1996). A pesar de ser numerosos los estudios que relacionan *O. coarctata* con los rendimientos del proceso y la calidad del efluente tratado, son escasos aquellos que los hacen directamente con variables ambientales de EDAR a escala real (Madoni, 1994b; Drzewicki & Kulikowska, 2011), siendo fundamentalmente descriptivos y/o exploratorios y no de carácter multivariante de interpretación ambiental.

- **Complejo *Vorticella aquadulcis***

V. aquadulcis no ha mostrado una relación significativa con la EF a partir de los modelos lineales de los biorreactores en los cuales presenta una elevada abundancia (CX y CT2), relacionándose de forma moderada-baja con valores bajos de la EF a partir del modelo lineal y unimodal de la matriz total OPE. Aunque nuestras observaciones parecen indicar una cierta influencia de *V. aquadulcis* con baja EF, los resultados no han sido lo suficientemente concluyentes como para afirmar dicha asociación. Los resultados de Lee *et al.* (2004) que relacionan (PCA y análisis bivariado) *V. striata* (*C.V. aquadulcis*) con elevada EF en planta piloto, ponen de manifiesto una vez más que la interpretación de los coeficientes de correlación entre organismos y variables ambientales dependen del rango de medida de estos últimos (Salvadó *et al.*, 1995). Dichos autores la asocian con elevados valores (en un rango de 1,1-2,7 y 0,5-3 días), resultados que muestran una tendencia similar a nuestras observaciones. Por otro lado, la relación con bajo TRHr observada a partir del modelo lineal y unimodal de CT1 sería consistente con el incremento de la carga orgánica (CM y CMDQOs) asociada a partir del modelo unimodal. Algunos autores relacionan *Vorticella octava*, también incluida dentro del C. *V. aquadulcis* (Foissner *et al.*, 1992), con un bajo TRHr, referido al rango 3-100 horas (Madoni *et al.*, 1993), tendencia también mostrada según nuestros resultados del modelo lineal de QB a partir del bajo coeficiente de correlación con alta CM, por encima de 0,16 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d. Estos resultados serían consistentes con los encontrados por Curds & Cockburn (1970b), los cuales observan una frecuencia de aparición moderada de *V. striata var. octava* (*C.V. aquadulcis*) en el intervalo de carga del fango 0,38-0,52 g DBO₅/g SSLM.d, así como con los encontrados por Martín-Cereceda *et al.* (1996), que relacionan *Vorticella striata* con elevada CM, referida al rango 0,02-1,4 g DBO₅/g SSLM.d y una elevada DBO₅ en el efluente tratado, referido al rango 2-170 mg/L. Por el contrario, Pérez-Uz *et al.* (2010) asocian *C.V. aquadulcis* con buen rendimiento de la eliminación de la DQO. Dichas discrepancias podrían ser debidas a que algunas de las especies pertenecientes al complejo *Vorticella aquadulcis* pueden estar influenciadas por distintos valores de las variables ambientales, siendo probablemente una de las razones por la cual, a pesar de encontrar elevadas densidades de población, no se han obtenido resultados concluyentes.

Una elevada CondLM ha sido asociada con la abundancia de *V. aquadulcis* a partir del modelo lineal de QB, pudiendo ser el resultado de sobrecargas en la planta, siendo contraria dicha asociación en el caso del modelo lineal de CT2. La asociación encontrada con bajo IVF30 a partir del modelo lineal de CT1 y CT2 no concuerda con los resultados de Hu *et al.* (2013a), que proponen a *Vorticella striata* como una especie bioindicadora de *bulking* filamentoso, relacionándose (RDA) con valores elevados del IVF. Los resultados contradictorios obtenidos podrían deberse a los diferentes rangos del IVF en las distintas EDAR; mientras que en CT1 y CT2 el valor del IVF se situó entre 81-161 y 64-160 g/mL, respectivamente, en los biorreactores del estudio de Hu *et al.* (2013a) se situaron entre 45-256 y 50-310 g/mL. Por otro lado, la asociación con un elevado %SSVLM encontrada a partir del modelo lineal de CT1 concuerdan con los resultados de Hu *et al.* (2013b), que asocian (PCA y análisis bivariado) *V. striata* con elevados valores de materia volátil en el fango activo (68 ± 8 y $67 \pm 10\%$). Hu *et al.* (2013a, b) también asocian esta especie con una baja T^ar, referido al rango 14,5-26,3 °C, lo cual no concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo. En nuestro estudio, *V. aquadulcis* ha sido relacionada con una elevada T^ar a partir de coeficientes de correlación moderados-bajos en ejes con baja variación explicada a partir del modelo lineal de CT2 (dbRDA2) y matriz total FQLM (dbRDA3), además, el modelo unimodal de CX la sitúa cercano al origen de coordenadas en la dirección del descenso de la T^ar, mientras que en la matriz total FQAF lo hace justo en el origen. Por todo ello, nuestros resultados sugieren que *V. aquadulcis* no está influida por la T^ar, o que el complejo lo forman distintas especies con diferente influencia a dicha variable.

La relación moderada-baja de *V. aquadulcis* con valores elevados de la CPT a partir del modelo lineal de la matriz total FQAF y matriz total de variables sin categorizar sería consistente con los valores de la EF, TRHr, CM y CMDQOs asociados. Dicha relación ha sido corroborada a partir del modelo unimodal de CX y matriz total FQAF, sin presentar valores extremos respecto a las variables ambientales, asociándose además en este último modelo al incremento de la CCarb, CProt y CN-NH₄⁺ del afluente. La elevada CProt ha sido también asociada con la abundancia de *V. aquadulcis* a partir del modelo lineal de CXCD.

Aunque nuestros resultados sugieran que la abundancia de *V. aquadulcis* responde al incremento de la carga del afluente, los resultados sobre la influencia del resto de variables, entre ellas la EF, son insuficientes, como también sugiere la ausencia de relaciones significativas encontrada por otros autores (Madoni *et al.*, 1993; Martín-Cereceda *et al.*, 1996; Hu *et al.*, 2013b). Como se ha indicado anteriormente, el complejo *V. aquadulcis* está constituido por diferentes especies y estas podrían mostrar diferentes asociaciones con las distintas variables, o quizás una adaptación a un amplio rango de la EF. Por todo ello y por las discrepancias entre los autores citados, sería interesante continuar estudiando la ecología de dicho complejo en las EDAR a escala real.

La capacidad bioindicadora de *V. aquadulcis* del bajo rendimiento del proceso de nitrificación discutido en el apartado anterior, podría estar de acuerdo con la abundancia de dicha especie con el incremento de la carga del afluente. No obstante, algunos autores la han relacionado (análisis bivariado y PCA) con buenos rendimientos de eliminación de la DQO y DBO₅ (Hu *et al.*, 2013b).

- **Complejo *Vorticella convallaria***

La abundancia de *V. convallaria* se ha asociado a valores de EF por debajo de 10 días a partir del modelo lineal y unimodal de CX, mientras que a partir del modelo lineal de DN lo ha hecho por encima de 20 días. Por otro lado, aunque a partir del modelo unimodal de la matriz total OPE se asocia con el descenso de la EF, la ausencia de relación significativa observada a partir del modelo lineal de dicha matriz podría estar indicando que *V. convallaria* es capaz de colonizar sistemas de fangos activos dentro de un amplio rango de EF. Estos primeros resultados concuerdan con los de Salvadó (1994) respecto a la presencia significativa de dicho complejo hasta 30 días (θ_b), si bien la mayor densidad parece encontrarse en el intervalo de 2-6 días. Los resultados también estarían de acuerdo con la presencia moderada y abundante encontrada en el rango de CM de 0,13-0,82 g DBO₅/g SSLM.d por Curds & Cockburn (1970b), aunque la mayor abundancia corresponde al rango 0,18-0,45 g DBO₅/g SSLM.d. Por otro lado, algunos autores han encontrado las mayores densidades de población en el intervalo 0,1-0,2 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d (Salvadó & Gracia, 1993), mientras que otros apuntan que tolera amplios rangos de carga orgánica (García-González, 2003). Por todo ello, nuestras observaciones sugieren que probablemente *V. convallaria* se encuentre más influenciada por valores bajos de la EF y valores moderados-altos de la CM, aunque consideramos necesario más estudios.

Los valores de T^ar por debajo de 20 °C a partir de los modelos lineales de CX, CT1, CT2 y matriz total FQLM y matriz total de variables sin categorizar, parecen mostrarse favorables para el desarrollo de *V. convallaria*. Además, estos resultados han sido corroborados a partir del modelo unimodal de CX, asociándose también con elevado NTLM, y en el modelo unimodal de la matriz total FQLM, en el que también se asocia ligeramente con el aumento del NTLM y %SSVLM. Estos resultados estarían de acuerdo con la asociación (análisis bivariado) encontrada por Chen *et al.* (2004) entre *V. convallaria* y una baja T^ar en 2 de las 5 EDAR estudiadas, aunque los resultados no fueron concluyentes. A pesar de no haber sido muy abundante en CT1y CT2, se ha asociado en ambas biorreactores con periodos de elevado IVF30, que en el caso de CT2 ha correspondido también con elevado %SSVLM. Por todo ello, nuestras observaciones sobre la influencia de valores bajos de T^ar en *V. convallaria* han sido concluyentes.

Respecto a la influencia de las variables FQAF, este peritrico se ha asociado de forma moderada-baja al incremento de la CPT y CProt y descenso de la CAG a partir del modelo lineal de CX, y en el caso del modelo lineal de CT2 con un elevado %DQOs. Estas relaciones concuerdan con la posición de *V. convallaria* cercana al origen de

coordinadas y en la dirección del incremento de la CPT, CProt, CCarb y CN-NH₄⁺ en el modelo unimodal de la matriz total FQAF. Los resultados de Martín-Cereceda *et al.* (1996), que la asocian (PCA) a alto contenido de N-NH₃ en el efluente tratado, coinciden con los encontrados en el presente trabajo. Además, todos estos resultados podrían ser consistentes a su vez con las tasas de crecimiento (r) moderadas-altas descritas para *V. convallaria* por Salvadó & Canals (2015), indicando su relación con moderadas-elevadas cargas orgánicas y elevadas tasas de división.

La relación encontrada de *V. convallaria* con una baja T^ar y carga moderada del afluente, así como su mayor abundancia en periodos de EF inferior a 10 días, justificaría su capacidad bioindicadora de bajo rendimiento del proceso de nitrificación, discutida en el apartado anterior. Son escasos los estudios que han conseguido asociar de forma significativa *V. convallaria* con las variables ambientales en EDAR a escala real (Salvadó, 1994), si bien algunos de ellos no encuentra relaciones concluyentes (Madoni *et al.*, 1993; Hu *et al.*, 2003b). Por último, algunos autores han asociado *V. convallaria* a condiciones de estabilidad del proceso (Madoni, 1994b) y efluentes con bajo contenido en DBO₅ (Curds, 1970b, 1982; Zhou *et al.*, 2006).

▪ Complejo *Vorticella infusionum*

V. infusionum se ha relacionado con elevados valores de la CM, CMDQOs y bajos de la EF y TRHr a partir del modelo unimodal de CX y matriz total OPE. Estos resultados estarían de acuerdo con los encontrados por Drzewicki & Kulikowska (2011), los cuales asocian (análisis bivariado) el incremento de la densidad de *V. infusionum* con elevada concentración de la DQO (2342 ± 647 mg/L), DBO₅ (1582 ± 452 mg/L) y nitrógeno amoniacal ($162,4 \pm 48,1$ mg/L) en el afluente, por lo cual este organismo se consideraría muy sensible a la calidad del efluente y la desestabilización del proceso. Por otro lado, dicha complejo se ha asociado con una baja concentración de SSLM a partir del modelo lineal y unimodal de la matriz total OPE, corroborando dicha asociación a partir del modelo unimodal de CX. Dicha influencia podría estar de acuerdo con la elevada CM y CMDQOs asociadas, puesto que mantener una baja concentración de SSLM en el reactor biológico puede contribuir a ocasionar sobrecargas orgánicas (p. ej. debidas a vertidos). Además, en este mismo modelo unimodal los mayores valores del TRHds parecen haber contribuido a una mayor abundancia de *V. infusionum*, dando indicios de tolerancia al déficit de OD. Dicha relación sería consistente con los valores bajos de ODm y ODb asociados a partir del modelo lineal de CT2 y unimodal de CT1.

Los valores de T^ar por debajo de 20 °C, asociados a partir del modelo lineal de CX, CT2 y matriz total de variables sin categorizar, así como a partir del unimodal de CX y la matriz total FQLM, parecen favorecer el desarrollo de *V. infusionum*. Esta peritrico también se ha asociado con el incremento del NTLM y PTLM a partir del modelo unimodal de CX, la CondLM en el caso de CT2, así como el NTLM y %SSVLM en el caso del modelo unimodal de la matriz total FQLM. Por todo ello, nuestras observaciones sugieren que *V. infusionum* se encuentra influenciada por valores

bajos de la T^ar. Por último, *V. infusioenum* se ha asociado a bajo %SSVLM, coincidiendo con valores del IVF30 superiores a 100 mL/g a partir del modelo lineal de CT1.

A pesar de haber mostrado una asociación moderada-baja a partir del modelo lineal de CX con baja CProt y elevada CAG, esta relación no ha sido considerada relevante debido a la baja variación explicada de los ejes dbRDA2 y dbRDA3 que se han relacionado con ambas variables. A partir del modelo lineal de la matriz total FQAF ha sido relacionada de forma moderada-baja con elevada CPT, mientras que a partir del modelo unimodal lo ha hecho con valores muy elevados del incremento de la CPT, CN-NH₄⁺, CProt y CCarb, y descenso de la relación DBO₅/PT. Estos resultados estarían de acuerdo con los obtenidos por Drzewicki & Kulikowska (2011), que asocian *V. infusioenum* con elevada carga de materia orgánica y amoniacal en el afluente, y por lo tanto, con la desestabilización del proceso biológico. Nuestros resultados también estarían de acuerdo con las elevadas tasas de crecimiento (μ) descritas para *V. infusioenum* por Salvadó & Canals (2015), los cuales encuentran la r máxima más elevada, indicando por tanto su relación con elevadas cargas orgánicas y elevadas tasas de división. Por último, indicar que *V. infusioenum* se ha asociado con valores bajos del %DQOs a partir del modelo lineal de CT2 y unimodal de CT1.

A pesar de la baja significación de la relación obtenida a partir de algunos modelos lineales, los modelos unimodales han mostrado una asociación con valores muy elevados de la carga orgánica del afluente y bajos de la T^ar y EF. La influencia de dichas variables ha permitido justificar la excelente capacidad bioindicadora de los bajos rendimientos del proceso de nitrificación discutidos en el apartado anterior. Los trabajos publicados que relacionan *V. infusioenum* con las variables ambientales en EDAR a escala real son más bien escasos. Entre ellos, destaca el realizado por Salvadó *et al.* (2001), en el cual determina la gran tolerancia a choques de carga de cloruro sódico (hasta dosis de 20 g/L), así como el correspondiente a Drzewicki & Kulikowska (2011).

▪ Complejo *Vorticella microstoma*

La elevada CM ha mostrado una clara influencia en la abundancia de *V. microstoma* a partir del modelo lineal de QB, por encima aproximadamente de 0,16 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d. Dichas observaciones serían similares a los resultados del estudio descriptivo de Salvadó & Gracia (1993), que encuentran una abundancia elevada de *V. microstoma* por encima de 0,2 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d, así como los encontrados por Curds & Cockburn (1970b), que observan elevadas densidades de la población en el intervalo de 0,2-0,67 g DBO₅/g SSLM.d. Madoni *et al.* (1993) encontraron la misma relación con el aumento de la carga del fango (referido al rango 0,01-0,8 g/g.d) y descenso de los SSLM (referido al rango 1,8-10,6 g/L), mientras que Santos *et al.* (2014) relacionaron bajas densidades de *V. microstoma* con una elevada CM (referida a rango 0,1-1,4 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d) y DBO₅ del afluente (referida al rango 110-780 mg/L). Puigagut *et al.* (2009) revelan la influencia de una elevada DQO total (1782 ± 612 mg/L) y DQOs (1012 ± 693 mg/L) con densidades elevadas de población. García-González (2003) sugiere que *V. microstoma*

se encuentra más relacionada con la disminución del OD que con el aumento de la carga orgánica. Todos los trabajos anteriores obtienen resultados no concordantes con los encontrados por Esteban *et al.* (1990, 1991), que relacionan inversamente esta especie con la carga orgánica afluyente. La discrepancia respecto a los resultados obtenidos probablemente sea debida a la inadecuada interpretación del análisis factorial y a la baja varianza explicada. En dichos análisis, la mayor carga factorial de *V. microstoma* (0,745) se observa en el primer factor (24,97% var. exp.), junto con una carga factorial inversa baja de la carga orgánica (-0,286), mientras que en el segundo factor (14,63% var. exp.) la contribución de las cargas se invierten, siendo en este caso baja para *V. microstoma* (-0,297) y alta para la carga orgánica. Por tanto, los resultados indican que la relación en el análisis exploratorio de ordenación debería haber sido considerado no relevante. El patrón observado de *V. microstoma* respecto a la EF ha sido muy similar al de *V. aquadulcis*, es decir; no ha mostrado una relación significativa con la EF misma a partir de los modelos lineales de los biorreactores y matriz total OPE. Además, los modelos unimodales no se relacionan con valores extremos de la EF, CM y CMDQOs, situándose cercano al origen de coordenadas y junto a *V. aquadulcis* en el sentido del incremento de la CM y disminución de la EF. Dicha tendencia probablemente haya sido debida a la baja densidad de población encontrada en el biorreactor DN, el cual se corresponde con los mayores valores de EF del estudio. A partir de lo indicado anteriormente, *V. microstoma* parece ser capaz de colonizar fangos activos con un amplio rango de EF, si bien muestra una tendencia a incrementar su abundancia al descender la EF. Estos resultados estarían de acuerdo con los encontrados por Salvadó (1994), que observa un incremento de la abundancia de *V. microstoma* por debajo de 15 días de EF (θ_b), así como los de otros autores que la relacionan directamente con baja EF (Madoni, 1994b). Por último, el bajo valor del TRHr asociado a partir del modelo unimodal de la matriz total OPE sería consistente con el incremento de la CM asociada en QB y matriz total OPE. Algunos autores han encontrado relaciones similares, asociando *V. microstoma* a bajo TRHr, referido al rango 3-100 horas (Madoni *et al.*, 1993).

Respecto a las variables FQLM, la elevada CondLM asociada a partir del modelo lineal de QB y CT2 sería consistente con el incremento de la carga del afluyente relacionada, probablemente por entrada de vertidos a planta. Por otro lado, la baja T^a_r ha mostrado a partir de los modelos lineales y unimodales de los biorreactores y matriz total FQLM una evidente influencia en el incremento de la densidad de población de *V. microstoma*, especialmente por debajo de 20 °C. Estos resultados estarían de acuerdo con la asociación (análisis bivariado) encontrada entre *V. microstoma* y baja T^a_r por Chen *et al.* (2004), si bien no obtiene resultados concluyentes. Junto con la baja T^a_r , este organismo se ha asociado con alto contenido del NTLM y %SSVLM a partir del modelo unimodal de CX y matriz total FQLM, relación entre ambas variables ya discutida anteriormente. Por todo ello, nuestras observaciones sobre la influencia de valores bajos de la T^a_r en *V. microstoma* han sido concluyentes. La relación encontrada con elevado valor del IVF30 a partir del modelo lineal de CT1 no sería contradictoria con los bajos valores relacionados por Lee *et al.* (2004), puesto que se trata de distintos rangos. Estos últimos autores indican su utilidad como especie indicadora

de buenas condiciones de la sedimentabilidad del fango activo. Además, Madoni *et al.* (1993) encontraron relaciones similares asociando *V. microstoma* con elevado IVF, referido al rango 31-472 mL/g.

V. microstoma se ha asociado a partir del modelo lineal de QB y matriz total FQAF con elevada CAG, no siendo considerada muy relevante en esta última debido a la baja variación explicada en el eje dbrDA4 (1,13%). A partir del modelo lineal de la matriz total FQAF no se ha encontrado una relación significativa con la elevada CPT, mientras que en su correspondiente modelo unimodal ha sido asociada con el incremento de carga (CPT, CN-NH₄⁺, CProt y CCarb) y descenso de la relación DBO₅/PT, sin encontrar correspondencia con valores extremos. La relación a partir del modelo lineal de CT2 con baja relación DBO₅/NT sería consistente con la relación directa encontrada con la CProt y CN-NH₄⁺. Nuestros resultados estarían de acuerdo con los descritos a escala de laboratorio (SBR), respecto a la dominancia de *V. microstoma* con elevadas concentraciones del NH₄⁺ (316 ± 63 mg/L), debido a las características del afluente procedente en parte de una granja porcina (Puigagut *et al.*, 2009). Además, también estarían de acuerdo con las elevadas tasas de crecimiento (r) descritas para *V. microstoma* por Salvadó & Canals (2015), los cuales encuentran la r máxima más elevada, indicando su relación con elevadas cargas orgánicas y elevadas tasas de división

Los resultados del modelo unimodal de la matriz total FQAF han revelado una sucesión de los cuatro complejos del género *Vorticella* respecto a los valores óptimos de la carga del afluente, siendo este género por tanto un excelente bioindicador del incremento de la carga orgánica. Dicho ejemplo de sucesión, así como los correspondientes a otros autores (Reid, 1969; Madoni & Antonietti, 1984; Becarés, 1994), pueden ser explicados en base a la diferente capacidad competitiva expresada en términos de la tasa de depredación. Fenchel (1980, 1986) propone que en el caso de protozoos filtradores, la tasa de captura de alimento es proporcional a la concentración de bacterias, la superficie de la zona de filtración del ciliado y a la velocidad de la corriente generada por el movimiento ciliar (que depende de la estructura de la ciliación oral). Basándonos en este razonamiento, altas concentraciones de bacterias, especies con una pequeña superficie ciliada, altas tasas de crecimiento (proporcional a la tasa de consumo de alimento que aumenta con la disminución del tamaño del ciliado) y altas constantes de saturación pueden llegar a ser dominantes durante periodos de incremento de la carga, como por ejemplo el complejo *V. infusionum*. Cuando la densidad bacteriana desciende, la existencia de una amplia superficie ciliada o una alta capacidad de creación de corrientes favorecerán el desarrollo de poblaciones características de media y baja carga orgánica, como por ejemplo el complejo *V. convallaria*. En resumen, nuestras observaciones sugieren que el complejo *V. infusionum* se encuentra favorecido por los valores más elevados de carga, seguidos en orden decreciente por *V. microstoma*, *V. aquadulcis* (ambas muy similares) y *V. convallaria*. El mismo orden ha sido también revelado en la búsqueda de bioindicadores del proceso de nitrificación discutido en el apartado anterior, respecto al incremento de la concentración del N-NH₄⁺ y NTs en el efluente. Por tanto, dicha sucesión tendría especial interés en la monitorización del proceso

biológico, siendo posible aproximar el grado de sobrecarga del reactor biológico, así como el mal rendimiento del proceso de nitrificación. Debido a la influencia del incremento de la carga orgánica afluente, discutida anteriormente, y a la tolerancia de *V. microstoma* a periodos de tiempo con bajas concentraciones del OD (Bick, 1972; Toman & Rejic, 1988; Madoni, 1988, 1994b; Madoni *et al.*, 1993; Dubber *et al.*, 2011b; Santos *et al.*, 2014), son numerosos los autores que han relacionado dicho complejo con una mala calidad del efluente tratado (Poole, 1984; Madoni, 1988; Esteban *et al.*, 1991; Madoni, 1993; Madoni, 1994b; Salvadó *et al.*, 1995). Por otro lado, algunos autores han revelado la gran tolerancia de *V. microstoma* a choques de carga de cloruro sódico (hasta dosis de 20 g/L) (Salvadó *et al.*, 2001).

Haptoridos

▪ *Acineria uncinata*

Acineria uncinata ha sido en ocasiones confundida con *Trachelophyllum pusillum*, especie pobremente descrita, como han indicado algunos autores (Augustin & Foissner, 1992a; Martín-Cereceda *et al.*, 1995). Por esta razón, hemos considerado interesante también la discusión de las características ecológicas descritas para *T. pusillum* por algunos autores.

El elevado TRHr ha mostrado una clara influencia en la abundancia de *A. uncinata* a partir del modelo lineal y unimodal de CT1, resultados que no serían consistentes con la moderada-baja relación de la baja EF asociada a partir del modelo lineal de CT2. Por otro lado, a pesar de la posición de *A. uncinata* cercana al origen de coordenadas y en la dirección del incremento de la CM y descenso de la EF en el modelo unimodal de CX, a partir del modelo lineal y unimodal de la matriz total OPE no se ha observado relación alguna, posicionándose justo en el origen de coordenadas de este último. Por todo ello, nuestras observaciones sugieren que la CM y EF, referidos al rango de 0,03-0,62 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d y 2-40 días, no parecen haber influido en la dinámica poblacional de *A. uncinata*. Estos resultados estarían de acuerdo con los coeficientes de correlación no significativos (análisis bivariado) encontrados entre la EF, CM y *A. uncinata* por algunos autores (Martín-Cereceda *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004), y en desacuerdo con la elevada EF relacionada por otros estudios (Drakides, 1978). Además, en el caso de *T. pusillum*, no se han encontrado referencias bibliográficas que indiquen una relación significativa con determinadas variables ambientales, como por ejemplo: la carga del fango, el TRHr, OD, IVF y/o SSLM (Madoni *et al.*, 1993) y la EF, SSLM, TRHr y OD (Hu *et al.*, 2013b). Curds & Cockburn (1970b) encontraron densidades moderadas y elevadas de *T. pusillum* en el intervalo de CM de 0,1-0,45 g DBO₅/g SSLM.d. Por otro lado, la relación con bajos niveles de ODM en DN, referido al rango 18-57% y teniendo en cuenta que el rango de ODb y ODa en esa misma posición (P1) fue de 44-82% y 0-24%, respectivamente, podrían dar indicios de tolerancia de *A. uncinata* a bajas concentraciones de OD. En cambio, los resultados de la relación encontrada con bajo ODM a partir del modelo lineal de CT2 serían poco relevantes, debido al mayor rango de ODa (4-87%) observado en la misma

posición (P2). Además, *A. uncinata* ha mostrado cierta influencia por valores del TRHds superiores a 6 horas a partir del modelo lineal de QB, sugiriendo una mayor resistencia a periodos anóxicos/anaerobios. Por todo ello, nuestras observaciones estarían de acuerdo con la tolerancia significativa de *A. uncinata* al incremento de ciclos anóxicos y anaerobios encontrada por Dubber & Gray (2011b), el efecto selectivo de la fase anóxica (Becarés, 1994), la relación con bajo OD (Drakides, 1978) y la tolerancia a largos periodos de ausencia de OD (Toman & Rejic, 1988; Cech *et al.*, 1993).

Aunque *A. uncinata* haya sido moderadamente relacionada con valores de la T^{ar} inferiores a 20 °C a partir el modelo lineal de CT2, el resto de modelos lineales y unimodales no la han asociado de forma significativa con esta variable. Según nuestros resultados, la T^{ar} no parece tener una influencia relevante en la dinámica poblacional de *A. uncinata*. En cambio, esta especie ha resultado asociada a partir de los modelos lineales de CT1 y CT2 con un elevado IVF30, principalmente por encima de 100 mL/g. Nuestras observaciones estarían de acuerdo con los valores elevados del IVF referenciados por Martín-Cereceda *et al.* (1995), sugiriendo su capacidad bioindicadora de mala calidad del fango. Además, Hu *et al.* (2013b) relacionó (análisis bivariado), aunque de una forma moderada-baja, *T. pusillum* con elevado IVF y %SSVLM. Aunque en un principio *A. uncinata* fue considerada especie libre-nadadora y asociada al flóculo por su tipo de alimentación (Madoni, 1994b), revisiones posteriores la han considerado como una especie reptante asociada al flóculo (Becarés, 1994; Martín-Cereceda *et al.*, 1995; Madoni, 1996), de tamaño pequeño (26-38 μm de longitud) y cuerpo aplanado (Martín-Cereceda *et al.*, 1995). Nuestras observaciones sugieren que dichas características morfológicas probablemente favorezcan el desarrollo de *A. uncinata* en estructuras floculares abiertas y disgregadas, debido a la presencia moderada-alta de bacterias filamentosas y que a su vez originan valores elevados del IVF. Debido a la disposición de su infraciliatura y forma aplanada-alargada del cuerpo, le permite reptar y acceder a floculos disgregados y abiertos con gran facilidad en busca de alimento. Por esta razón, es probable que en ocasiones sea más competitiva que otros organismos reptantes, que no presentan dichas características morfológicas, como por ejemplo *Aspidisca cicada*. Esta podría ser una de las razones que expliquen la mayor abundancia de esta última en periodos del IVF30 bajos y de *A. uncinata* en periodos de valores más elevados.

La relación moderada-baja encontrada a partir del modelo lineal de CT2 con bajo %DQOs y DBO_5/PT no parece indicar una influencia significativa de elevadas cargas en el afluente. Además, no han sido encontradas relaciones significativas directas con variables que representen dichas cargas (CPT, CCarb, CProt y CN-NH_4^+) a partir del modelo lineal y unimodal de la matriz total FQAF, a excepción de la relación moderada-baja con elevada CPT a partir del modelo lineal de la matriz de variables sin categorizar. Dichas observaciones, junto con las obtenidas respecto a las variables OPE y FQLM, indicarían que la dinámica poblacional de *A. uncinata* no parece encontrarse influenciada por las variables ambientales exploradas en el presente trabajo. Dichas conclusiones serían consistentes con el amplio rango de carga asociada a *A. uncinata* por numerosos autores. Algunos de ellos la encuentran asociada

a condiciones de media y alta carga (Vedry, 1987; Madoni, 1988), siendo capaz de tolerar altas concentraciones de amonio (Duchene, 1991). Klimowicz (1970, 1974) observan abundantes poblaciones cuando se opera con altas CM (0,86-1,36 Kg DBO₅/Kg.d) y TRHr de 3-4 horas, mientras que Sladka & Sladeck (1985) encuentran el intervalo óptimo de CM entre 0,1-0,4 Kg DBO₅/Kg.d, pudiendo estar presente en un amplio rango (0,01-4 Kg DBO₅/Kg.d). Puigagut *et al.* (2009) la encuentran dominante en un SBR piloto a escala de laboratorio alimentado con un porcentaje de agua residual procedente del sector porcino, con elevada concentración de la DQO total (1782 ± 647 mg/L), DQOs (1012 ± 693 mg/L) y nitrógeno amoniacal (316 ± 63 mg/L). En el estudio de Drzewicki & Kulikowska (2011), realizado en una EDAR con entrada temporal de agua residual procedente de tanques sépticos, se relaciona el incremento de *A. uncinata* con una elevada concentración de la DQO (2342 ± 647 mg/L), DBO₅ (1582 ± 452 mg/L) y nitrógeno amoniacal (162,4 ± 48,1 mg/L) en el afluente, mientras que Martín-Cereceda *et al.* (1995) la relacionan con baja concentración de la DQO y DBO₅ en el afluente. Además de encontrarse en instalaciones que tratan aguas residuales urbanas, ha sido observada de forma muy abundante en algunas procedentes del sector industrial farmacéutico (Becarés, 1994), papelerero (Salviati *et al.*, 1991) o de fabricación de refrescos (Morishita, 1976).

El amplio rango de carga del afluente, EF y T^r asociados a la abundancia de *A. uncinata* justificaría la ausencia de su capacidad bioindicadora del proceso de nitrificación. En este sentido, algunos autores han concluido que *A. uncinata* no debería ser considerada una especie indicadora (Dubber & Gray, 2011a). Por otro lado, los resultados del estudio de Salvadó & Canals (2015) han permitido describir elevadas tasas de crecimiento (r) para *A. uncinata*, encontrando la r máxima más elevada, indicando por tanto su relación con elevadas cargas orgánicas y elevadas tasas de división. En cuanto a sus hábitos de alimentación, inicialmente se la ha clasificado como depredador de flagelados y otros ciliados (Reid, 1969; Drakides, 1978), aunque dicha clasificación puede deberse a determinaciones erróneas ya que ha sido comúnmente confundida con *Litonotus* sp. (Becarés, 1994; Martín-Cereceda *et al.*, 1995). La clasificación que lo incluye dentro del grupo de protistas bacterívoros-detritívoros parece ser más adecuada (Pratt & Cairns, 1985; Becarés, 1994). A partir de nuestros resultados y a partir de todas las interesantes aportaciones realizadas por los autores anteriormente citados, sugerimos que probablemente la abundancia de *A. uncinata* se encuentre determinada por variables biológicas y fisicoquímicas del flóculo. Aunque parece probable que el aumento del IVF favorezca su desarrollo, sería interesante continuar investigando las características ecológicas de dicho organismo con el fin de esclarecer su dinámica poblacional.

5.3.2.4 Metazoos

- *Lecane* sp.

El modelo lineal de QB ha permitido demostrar que *Lecane* sp. resulta influido por una baja CM, principalmente por debajo de 0,16 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d. Además, a partir del mismo modelo ha sido asociado a elevado TRHds, por encima de 6 horas. Dichas observaciones serían consistentes con las de Salvadó *et al.* (1993), encontrando abundantes densidades de rotíferos cuando los valores de la CM se sitúan por debajo de 0,20 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d. Por otro lado, *Lecane* sp. ha mostrado una evidente influencia de elevados valores de la EF a partir de los modelos lineales y unimodales de CX, CT2 y matriz total OPE, además del elevado TRHr y la baja carga orgánica del afluente (CM y CMDQOs) a partir de los modelos unimodales de estos dos últimos. Parte de dichas observaciones serían consistentes con la asociación encontrada entre el grupo de los rotíferos y la elevada EF por Hu *et al.* (2013b). Por todo ello, nuestros resultados sugieren que *Lecane* sp. es un excelente bioindicador de elevada EF y baja carga orgánica del afluente (CM y CMDQOs). Por otro lado, su relación con bajos niveles de O_{Dm} en DN, referido al rango 18-57% y teniendo en cuenta que el rango de O_{Db} y O_{Da} en esa misma posición (P1) se encontró en el rango de 44-82% y 0-24%, respectivamente, darían indicios de tolerancia de *Lecane* sp. a bajas concentraciones de OD, estando de acuerdo con la relación directa observada con el TRHds (por encima de 6 horas) a partir del modelo lineal de QB.

A pesar de la influencia de la elevada T^ar observada a partir del modelo lineal de CX, el modelo lineal de CT1 ha revelado una relación moderada-baja con valores de T^ar inferiores a 20 °C, incluso la matriz total FQLM no ha mostrado relación con dicha variable. Estos resultados corroboran la posición de *Lecane* sp. en el origen de coordenadas, en el sentido del incremento de la T^ar en el modelo unimodal de CX y matriz total FQLM. En estos últimos modelos el óptimo de T^ar se encuentra por debajo de la óptima para algunos protistas, característicos del buen rendimiento de la nitrificación. Por todo ello, nuestros resultados sugieren que la T^ar probablemente no se encuentre entre las variables con mayor influencia en la abundancia de *Lecane* sp, adquiriendo mayor importancia en los periodos con valores bajos de EF. Nuestras observaciones estarían de acuerdo con los resultados de Hu *et al.* (2013b), en los cuales no se encuentra una relación significativa entre la T^ar y la abundancia de rotíferos. Por otro lado, *Lecane* sp. se ha asociado a partir del modelo lineal de CT1 a valores del IVF30 superiores a 100 mL/g, coincidiendo con bajo %SSVLM. Teniendo en cuenta que el incremento del IVF30 en CT ha sido debido a la presencia de bacterias filamentosas, entre ellas GALO y *Microthrix parvicella*, dichos resultados podrían ser consistentes con la actividad predatoria de *Lecane inermis* sobre la población de *Microthrix parvicella*, *Haliscomenobacter* sp., *Thiothrix* sp., *Nostocoida limicola* y los morfotipos 021N y 0092 encontrada por algunos autores (Fialkowska & Pajdak-Stós, 2008; Korceba-Soroka *et al.*, 2013; Drzewicki *et al.*, 2015; Kowalska *et al.*, 2014, 2015). Dichos autores

sugieren que *Lecane inermis* es capaz de reducir de forma significativa la población de los organismos filamentosos citados, y de esta forma mejorar las propiedades de sedimentabilidad del fango en episodios de *bulking* y *foaming* filamentosos. Por último, la asociación encontrada con elevado pHLM no ha sido considerada relevante, debido al estrecho rango observado (7,05-7,79) y baja variación explicada del dbRDA3 (4,38%) en el cual se ha relacionado.

Lecane sp. se ha asociado a una baja CAG a partir del modelo lineal de QB, coincidiendo con bajas cargas del afluente y una elevada CN_i, en este caso dando indicios de tolerancia a la presencia de níquel. Por otro lado, la relación observada con valores bajos de la CPT, por debajo de 15 g/Kg SSVLM.d, a partir del modelo lineal de CXCD, matriz total FQAF y matriz total de variables sin categorizar, estarían de acuerdo con los valores de la EF asociados. Dicha relación ha sido también observada a partir de los modelos unimodales, junto con bajos valores de CAG, CCarb, CProt y CN-NH₄⁺. Por último, la relación encontrada con elevada relación DBO₅/PT a partir del modelo lineal de CT2 y unimodal de la matriz total FQAF, serían consistentes con la baja CPT asociada. Por todo ello, nuestras observaciones sugieren que *Lecane* sp. es un excelente bioindicador de cargas débiles, especialmente de la CPT.

La capacidad bioindicadora del buen rendimiento de la nitrificación de *Lecane* sp., discutido en el apartado anterior, estaría justificada principalmente por la influencia de bajas cargas del afluente y elevada EF. No hemos encontrado resultados concluyentes en la bibliografía que relacionen directamente *Lecane* sp. con las variables ambientales en EDAR a escala real. Algunos autores han estudiado la resistencia de *Lecane* sp., entre otros organismos, a cargas progresivas de NaCl (Salvadó *et al.*, 2001). Hasta el momento los estudios se han centrado en la búsqueda de relaciones de grupos más amplios, como por ejemplo los rotíferos con rendimientos del proceso y variables ambientales (Salvadó *et al.*, 1993; Chen *et al.* 2004; Hu *et al.*, 2013b). Otros autores sugieren que la abundancia de metazoos (principalmente *Lecane* sp.) podría ser la causa de la disminución del tamaño flocular, debido a su forma y actividad en la alimentación (Puigagut *et al.* 2007), además, dichos autores sugieren que la abundancia de estos organismos podría también ser la causa del menor nivel de nitrificación observado, debido principalmente a la actividad depredadora de los metazoos sobre la población de bacterias nitrificantes. Algunos autores, como se ha citado anteriormente, han centrado su interés en la actividad depredadora de *L. inermis* sobre la población de bacterias filamentosas, mientras que otros lo han hecho sobre su efecto en la comunidad de ciliados (Fyda *et al.*, 2015).

- ***Rotaria* sp.**

Las características ecológicas observadas en *Rotaria* sp. han sido muy similares a las asociadas a *Lecane* sp. La EF elevada se ha asociado a este género a partir del modelo lineal y unimodal de CX y matriz total OPE, junto con la baja CM, CMDQOs y el elevado TRHr a partir del modelo unimodal de la matriz total OPE, siendo por tanto también un excelente bioindicador de altos valores de la EF y cargas orgánicas débiles. Estos resultados serían

consistentes con la mayor densidad de población de rotíferos observada con valores de CM por debajo de 0,2 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d por Salvadó & Gracia (1993), así como la observada con valores elevados de EF (referido al rango 3,9-45,3 días) por Hu *et al.* (2013b).

Aunque ha sido relacionada con elevada T^ar a partir de los modelos lineales de CX (coincidiendo con bajo NTLM) y CT2 (coincidiendo con baja CondLM), el modelo lineal de la matriz total FQLM no ha mostrado relación y los modelos unimodales han mostrado que los óptimos de la T^ar no han sido elevados. Por ello, la T^ar no parece ser una variable muy influyente en la dinámica de *Rotaria* sp., probablemente adquiriendo mayor importancia con respecto a valores bajos de la EF. Algunos autores han asociado el grupo de los rotíferos con baja T^ar (Chen *et al.*, 2004).

La baja CAG asociada a partir del modelo lineal de QB y la baja CPT asociada a partir de los modelos lineales y unimodales de CX, matriz total FQAF y matriz total de variables sin categorizar, así como los bajos valores de la CAG, CCarb, CProt y CN-NH₄⁺ encontrados a partir del modelo unimodal de esta última, sugieren a *Rotaria* sp. como un excelente bioindicador de la carga débil en el proceso biológico, especialmente de la CPT.

La capacidad bioindicadora del buen rendimiento de la nitrificación de *Rotaria* sp., discutido en el apartado anterior, estaría justificada principalmente por la influencia de bajas cargas del afluente y elevada EF. No constan estudios concluyentes que relacionen directamente *Rotaria* sp. con las variables ambientales en EDAR a escala real, centrándose los estudios hasta el momento en la búsqueda de relaciones de grupos más amplios, como es el caso de los rotíferos y metazoos (Hu *et al.*, 2013b).

5.4 Dinámica poblacional de la comunidad de bacterias filamentosas en respuesta al factor biorreactor y estacional.

Desde la publicación en 1981 de la primera guía sistemática de Eikelboom y van Buijsen, describiendo los principales organismos filamentosos más comunes en fangos activos, han sido numerosos los estudios en EDAR que han descrito la ocurrencia de los diferentes morfotipos filamentosos implicados en episodios de *bulking* y *foaming* en los cinco continentes (Martins *et al.*, 2004). La búsqueda de patrones de distribución de bacterias filamentosas, empleando microscopía convencional y técnicas moleculares, en función del tipo de proceso (factor biorreactor) y la estación del año (factor estacional) ha sido objeto de estudio entre la comunidad científica, destacando las revisiones y trabajos realizados por Madoni *et al.* (2000), Martins *et al.* (2004), Frigon *et al.* (2006), Seviour *et al.* (2008), Nielsen *et al.* (2009a), Mielczarek *et al.* (2012), Wang *et al.* (2015). A pesar de ello, hasta el momento no constan entre las principales referencias publicadas el empleo de rutinas multivariantes para el análisis de las diferencias significativas entre grupos (ANOSIN y PERMANOVA), análisis exploratorio (nMDS) e interpretación ambiental (CAP) a partir de la comunidad bacteriana de microorganismos filamentosos y según el factor biorreactor y estacional, siendo probablemente el presente trabajo uno de los primeros empleando dicho enfoque numérico. Por otro lado, Nielsen *et al.* (2009a) señalan que solo unas pocas especies de bacterias filamentosas pueden ser identificadas convencionalmente utilizando los rasgos morfológicos propuestos por Eikelboom (2000) y Jenkins *et al.* (2004), insistiendo en la necesidad de utilizar las técnicas moleculares (p.ej. FISH) siempre que sea posible. En este sentido, algunos autores han centrado sus principales objetivos en el estudio de la identificación de bacterias filamentosas comparando ambas técnicas (Müller *et al.*, 2005; Andújar *et al.*, 2013, Calvo *et al.*, 2016, Zornoza *et al.*, 2016a, b). En nuestro trabajo, se han identificado 17 morfotipos filamentosos combinando técnicas convencionales y moleculares (técnica FISH con 26 sondas específicas). Todavía se desconoce la afiliación de algunos de los morfotipos filamentosos descritos por Eikelboom (2000) y Jenkins *et al.* (2004), como por ejemplo: tipo 0211, tipo 0961, tipo 1852, tipo 1702 y tipo 0581, a pesar de que este último ha sido afiliado al filo *Chloroflexi* (Zornoza *et al.*, 2006). En EDAR industriales o en instalaciones con aportes importantes de aguas residuales industriales son numerosas las bacterias filamentosas que hasta el momento se desconoce su afiliación (Eikelboom, 2006).

Nuestros resultados han revelado la presencia de algunos morfotipos los cuales no han podido ser afiliados utilizando los rasgos morfológicos convencionales y que consideramos que sería muy interesante continuar con su estudio. Entre ellos, un organismo filamentosos muy similar al tipo 021N de Eikelboom (denominado en nuestro trabajo como tipo 021N*) pero de menor diámetro celular, aproximadamente 1-1,2 μm , y reacciones similares a las tinciones de Gram y Neisser. Dicho organismo, el cual no ha hibridado con la sonda general *Thiothrix* (G123T), se ha encontrado presente en todos los biorreactores. Además, otros organismos filamentosos se han encontrado también en algunos biorreactores particulares, como por ejemplo, los denominados CX-02 y CX-03 en los

biorreactores CX-AB y CXCD. Las características morfológicas y respuestas a las tinciones diferenciales del microorganismo CX-02 son muy similares al morfotipo 1852 de Eikelboom, por lo que consideramos que probablemente se trate de dicho morfotipo. En el caso del morfotipo CX-03, no parece corresponderse con ninguno de los propuestos por Eikelboom (2000) y Jenkins *et al.* (2004), presentándose como filamentos de longitud mayor a 200 μm y diámetro entre 0,8-1,4 μm , y células rectangulares de longitud normalmente mayor de 5 μm , cuya tonalidad clara es similar al morfotipo 0961. Una característica singular de dicho morfotipo es la observación frecuente de “puntos oscuros” ocupando casi el ancho celular a lo largo del tricoma, coincidiendo en algunos casos con la posición de los septos. Otro de los microorganismos que han mostrado una característica singular ha sido un filamento parecido a *M. parvicella* en el biorreactor QB (denominado en nuestro estudio como *M. parvicella**), pero con reacción positiva a la tinción de Neisser, lo cual hasta el momento no parece estar documentado.

Tanto las rutinas ANOSIM y PERMANOVA, como el escalamiento multidimensional no métrico (nMDS) y el análisis canónico de coordenadas principales (CAP) han revelado la existencia de diferencias significativas y patrones de distribución entre muestras según el factor biorreactor. Estos resultados indican que la abundancia y dinámica poblacional de la comunidad de bacterias filamentosas se encuentra influenciada por diferencias ambientales particulares entre los distintos biorreactores. Por otro lado, los biorreactores dispuestos como líneas independientes en paralelo en la EDAR CX (CXAB-CXCD) y CT (CT1-CT2) no mostraron diferencias significativas, resultados esperados teniendo en cuenta las características similares, como son: el diseño de reactor, modo de operación y características fisicoquímicas del agua residual afluente. Aunque algunos autores han descrito la dominancia de determinados morfotipos filamentosos en función del tipo de proceso (eliminación de C; C y N; C, N y P) (Madoni *et al.*, 2000), las últimas revisiones agrupan la frecuencia de determinadas bacterias filamentosas identificadas mediante técnicas moleculares en cuatro grandes grupos, teniendo en cuenta la eliminación de nutrientes, carbono, y tratamiento de aguas residuales industriales y municipales (Nielsen *et al.*, 2009a). Algunas de nuestras observaciones estarían de acuerdo con los grupos propuestos por Nielsen *et al.* (2009a), como por ejemplo; la abundancia de bacterias filamentosas pertenecientes a la clase *Alfaproteobacteria* (*Ca.* ‘*M. batavus*’) en la EDAR CX, caracterizada por valores bajos-medios de la EF, baja capacidad de desnitrificación y entrada significativa de aguas residuales industriales (grupo 1). Además, también estarían de acuerdo con la abundancia observada de GALO en la EDAR CT, caracterizada por valores bajos-medios de EF, baja capacidad de desnitrificación y entrada de aguas residuales domésticas (grupo 2), mientras que la abundancia de *Ca.* ‘*M. parvicella*’ en la EDAR DN se correspondería con su ubicación en el grupo 4, referente a instalaciones municipales con eliminación del nitrógeno. Nuestras observaciones sobre la presencia común de bacterias pertenecientes al filo *Chloroflexi* durante periodos de buenos rendimientos de eliminación del nitrógeno estarían de acuerdo con los resultados de algunos autores, que indican su colonización en EDAR diseñadas para la eliminación de nutrientes (Björnsson *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2009a; Mielzcarek *et al.*, 2012).

La búsqueda de patrones de distribución de la comunidad de microorganismos filamentosos según la estacionalidad se ha encontrado entre los objetivos de numerosos trabajos de investigación, probablemente motivados por la aparición cíclica de los episodios de *bulking* y *foaming*. Es evidente que la T^ar se encuentra íntimamente asociada a la estacionalidad, y que el crecimiento de algunas bacterias puede verse favorecido por ciertos intervalos característicos de temperatura, como ocurre con *Ca. 'M. parvicella'*. Pero además, consideramos la necesidad de tener en cuenta otros factores relacionados con la propia instalación, como por ejemplo: su forma de operar, los problemas en planta que se dan de forma cíclica (p. ej. problemas en la evacuación de fangos, etc.), variaciones en la cantidad y tipo de carga afluente (p. ej. vertidos en campañas, movimiento poblacional, etc.), siendo difícil por ello la búsqueda de patrones temporales acorde con la estacionalidad. En este sentido, la comparación entre los resultados de los distintos trabajos publicados y la unificación de criterios deberían tomarse con extrema precaución. Un buen ejemplo de ello podría ser el rango anual de la T^ar. En nuestro estudio el rango fue de 11-29 °C, mientras que en el correspondiente a Mielczarek *et al.* (2012) fue de 7-20 °C.

Los resultados del nMDS y ANOSIM sobre la exploración de las distancias entre grupos de muestras a partir del factor estacional han revelado la escasa distribución de las poblaciones debido a dicho factor, a pesar de las diferencias significativas encontradas entre otoño-primavera e invierno a partir de la rutina PERMANOVA. Los resultados del CAP parecen estar de acuerdo con los resultados del nMDS, ANOSIM y PERMANOVA, siendo bajos los coeficientes de correlación de ambos ejes (CAP1 y CAP2) y porcentajes de asignación de los muestreos. Todo ello nos ha llevado a concluir que el factor estacional no parece contribuir de forma significativa a la dinámica poblacional de microorganismos filamentosos, siendo nuestros resultados muy similares a los hallados por Mielczarek *et al.* (2012), los cuales no encontraron un patrón estacional claramente definido. Dichos autores encuentran frecuente a *Ca. 'M. parvicella'* en invierno, mientras que en otoño lo son los miembros del filo *Candidatus* TM7 (T0041/0675). Nuestras observaciones sobre la relación estacional de ambos microorganismos han sido idénticas a las de Mielczarek *et al.* (2012), siendo *Ca. 'M. parvicella'* el organismo que mostró el mayor coeficiente de correlación en nuestro estudio. Otras bacterias han mostrado coeficientes moderados, como por ejemplo; *Nostocoida limicola* III y tipo 0411, relacionadas con invierno y parte de la primavera, y tipo 0581, tipo 0092, tipo 0092-A y tipo 0041, relacionadas con verano y parte de otoño. Además, son numerosos los autores que han atribuido el crecimiento excesivo de *M. parvicella* a la estación de invierno (Madoni & Davoli, 1997; Eikelboom, 2000, 2006), invierno y primavera (Martins *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2015) o climas fríos (Rossetti *et al.*, 2005).

5.4.1 *Búsqueda de modelos de interpretación ambiental*

Los episodios de *bulking* y *foaming* filamentoso continúan originando serios problemas operacionales en las instalaciones de tratamiento de aguas residuales por fangos activos, siendo estos ampliamente descritos y revisados por numerosos autores (Eikelboom, 2000; Martins *et al.*, 2004; Jenkins *et al.*, 2004; Tandoi *et al.*, 2006; Seviour & Nielsen, 2010a). Más de 30 morfotipos filamentosos han sido descritos en fangos activos tratando aguas residuales urbanas (Eikelboom, 2000; Jenkins *et al.*, 2004), y algunos más encontrados en fangos tratando aguas residuales industriales (Eikelboom & Geurkink, 2002; Eikelboom, 2006). Con el desarrollo de métodos moleculares de cultivo independiente nuestro conocimiento sobre la identificación de bacterias filamentosas y otras poblaciones se ha incrementado de forma considerable. Estudios recientes utilizando métodos moleculares, como la conocida técnica FISH, han revelado que la identificación de bacterias filamentosas utilizando rasgos morfológicos y tinciones no es aconsejable en la mayoría de casos. A pesar de ello, muchas instalaciones continúan utilizando de forma rutinaria las claves de identificación convencionales ante episodios de crecimiento excesivo de microorganismos filamentosos. Por esta razón, uno de nuestros objetivos se ha centrado principalmente en comparar la identificación convencional y la técnica FISH.

Muchos de los estudios sobre bacterias filamentosas han sido realizados en diferentes tipos de EDAR con el fin de conocer aquellos factores que determinan su presencia, como son: la composición del agua residual, el diseño de la planta y sus variables de operación (Kampfer, 1997; Madoni *et al.*, 2000; van der Waarde *et al.*, 2002). En este sentido, han sido definidos grupos específicos de microorganismos filamentosos a partir de las condiciones de operación asociadas, así como a partir de las medidas de control más efectivas (Wanner & Grau, 1989; Wanner, 1994; Eikelboom, 2000; Jenkins *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta que dichos estudios no han incluido herramientas moleculares para la identificación de bacterias filamentosas, la mayoría de conclusiones deberían ser cuestionadas y tomadas como orientativas. Por esta razón, nuestros objetivos también se han centrado en la comparación de las características ecológicas de las distintas bacterias empleando ambas técnicas.

La ecología y el comportamiento competitivo de las distintas bacterias filamentosas se encuentran determinados por un amplio rango de características fisiológicas, como son: la capacidad de absorción del sustrato, la capacidad respiratoria, la habilidad de almacenar sustratos intracelularmente, la capacidad exoenzimática y las propiedades de la superficie celular. En cambio, solo unos pocos cultivos axénicos de microorganismos filamentosos están disponibles para el estudio de dichas características, siendo además muy arriesgado extrapolar dicha información a la fisiología *in situ* de las EDAR (Nielsen *et al.*, 2009a). Debido a la ausencia de cultivos representativos para muchos de los organismos filamentosos, así como las diferencias entre el fenotipo de cultivos axénicos y el observado *in situ*, los principales estudios de bacterias filamentosas han centrado sus objetivos en la determinación de la fisiología *in*

situ a través de métodos de cultivo independiente (ecofisiología *in situ*). La mayoría de métodos utilizados para el estudio de la ecofisiología, así como los resultados obtenidos de las diferentes bacterias filamentosas identificadas a partir de sondas moleculares (FISH), se encuentran ampliamente documentados en distintas revisiones (Nielsen *et al.*, 2009a; Seviour & Nielsen, 2010a). A pesar de los avances sobre el conocimiento de la ecofisiología de la comunidad de bacterias filamentosas, los estudios de ecología en plantas a escala real empleando sondas moleculares para su identificación han sido más bien escasos, siendo pobres y poco consistentes sus resultados. Consideramos que estos resultados podrían ser debidos a diferentes motivos, entre ellos: la baja frecuencia de los muestreos y/o duración del periodo de toma de datos experimentales, el bajo número de variables ambientales utilizadas y la falta de metodologías que permitan la interpretación ambiental. En este sentido, Mielzareck *et al.* (2012) utilizan una frecuencia baja de muestreo en la mayoría de plantas estudiadas (entre 2 y 4 veces al año durante 3 años), mientras que a pesar de la elevada frecuencia de muestreos en una de ellas (2 veces a la semana) su duración es baja (3 meses). Respecto a la metodología empleada para la búsqueda de asociaciones, dichos autores utilizan análisis bivariado y PCA, herramientas útiles para la exploración ambiental y no para su interpretación. En el caso del estudio de Santos *et al.* (2015), a pesar de utilizar un mayor número de variables ambientales, utilizan una frecuencia baja de muestreo (muestras cada 3 meses, durante 2 años) y análisis estadístico exploratorio (análisis bivariado y factorial). Milobędzka *et al.* (2016) utilizan un número escaso de variables y baja frecuencia de muestreo (4 veces al año, durante 3 años), siendo la metodología estadística en este caso de carácter exploratorio (análisis bivariado, clúster y PCA). Algunos de los estudios más relevantes, empleando técnicas moleculares distintas a la técnica FISH, como es el análisis metagenómico, podrían ser los correspondientes a Maza-Márquez *et al.* (2015) y Wang *et al.* (2015). Ambos estudios, a pesar de utilizar un número escaso de variables ambientales, utilizan técnicas estadísticas de interpretación ambiental (RDA y BIO-ENV). Por último, destacar el trabajo realizado sobre episodios de *foaming* estacional por Frigon *et al.* (2006), con una elevada frecuencia y duración del muestreo (semanal durante 1 año), empleando análisis de pautas (*path analysis*), regresión multivariante y PCA.

La selección de variables ambientales, previa exploración de la inercia biológica, así como la categorización de las mismas para la interpretación ambiental no ha sido hasta el momento bien documentado, siendo probablemente la primera vez que se utiliza dicho enfoque en un estudio de interpretación ecológica de bacterias filamentosas en instalaciones a escala real. Por otro lado, otra característica interesante de nuestro estudio es el elevado número de variables ambientales y biológicas utilizadas, siendo probablemente uno de los trabajos más completos realizados hasta el momento. Por último, el estudio espacio-temporal realizado en distintos biorreactores que difieren en su operación y diseño, junto con una frecuencia quincenal de muestreo durante un año y la construcción de modelos lineales basados en la distancia para la interpretación ecológica, lo hacen interesante para avanzar en la comprensión de la dinámica poblacional de microorganismos filamentosos en fangos activos. Desde que la técnica FISH apareció como una herramienta alternativa frente a la identificación convencional, los esfuerzos científicos se han centrado

principalmente en dilucidar la posición taxonómica de los distintos microorganismos del fango activo. Los avances en la taxonomía y los estudios de ecofisiología *in situ* de microorganismos filamentosos realizados hasta el momento han aportado sorprendentes y valiosos resultados, siendo necesario el desarrollo de estudios de ecología en plantas a escala real para integrarlos, y de esta forma, avanzar en la prevención y solución de los problemas operacionales en las instalaciones derivados de la presencia excesiva de bacterias filamentosas.

Tal cual se ha señalado anteriormente, hasta el momento no constan estudios de ecología de bacterias filamentosas en fangos activos que hayan explorado la inercia biológica de la EF, CM, TRHr, TRHds y OD, y en el caso de esta última, además la posición más adecuada de control del OD. Nuestros resultados han demostrado la importancia de este análisis previo a la búsqueda de las relaciones entre las variables biológicas y ambientales, siendo probablemente el motivo por el cual algunos autores no hayan encontrado relaciones significativas de algunas variables ambientales, como son la EF y CM (Santos *et al.*, 2015; Maza-Márquez *et al.*, 2015). Además, este paso debería considerarse imprescindible, puesto que cada instalación, por su diseño, operación y características fisicoquímicas puede encontrarse caracterizada por una inercia biológica distinta, tal cual se ha demostrado a partir de los resultados obtenidos en el conjunto de las EDAR estudiadas. Uno de los ejemplos se corresponde con los biorreactores QB, CXAB, CXCD, DN y CT1, en los cuales la comunidad de microorganismos filamentosos parece asociarse a las purgas de fangos en exceso de los siete días anteriores al muestreo, mientras que en el caso del biorreactor CT2 parece asociarse más a las purgas de los dos y tres días anteriores. En este sentido, la rutina BIO-ENV, que relaciona la matriz distancia biológica con cada una de las variables ambientales a explorar, ha permitido seleccionar previamente aquellas que contribuyeron a explicar la mayor variabilidad de la comunidad biológica en los modelos de interpretación ambiental.

Según nuestras observaciones, la exploración de las variables ambientales agrupadas en función de ciertas categorías parece ser un paso crítico también necesario a explorar previo a la construcción de modelos de interpretación ambiental. Los resultados de la rutina BVSTEP y test secuencial del DISTLM han sido concluyentes para comprender y establecer las estrategias a seguir en la posterior construcción de los modelos. La rutina BVSTEP nos ha permitido revelar la heterogeneidad de los modelos de los distintos biorreactores y matriz total, poniendo de manifiesto que cada biorreactor aporta una información biológica distinta de cada una de las categorías seleccionadas: OPE, FQLM y FQAF. Un patrón que se repite en cada una de las categorías es el incremento de variables seleccionadas y la disminución del total de la variación biológica explicada respecto a algunos biorreactores individuales cuando se contempla el conjunto de todos ellos (lo que hemos denominado matriz total), revelando que la construcción de modelos a partir de matrices conjuntas puede originar resultados pobres. Además, la no categorización origina la pérdida de información ambiental de algunas variables con información relevante en la categorización, así como el incremento significativo del número de variables, lo cual repercute en la baja calidad de

predicción de los modelos. A modo de ejemplo, algunos trabajos de investigación publicados (Mielczarek *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2015; Miłobędzka *et al.*, 2016) han explorado la influencia de ciertas variables ambientales sin categorizar en la dinámica poblacional de bacterias filamentosas a partir de matrices englobando distintos biorreactores, siendo escasos los resultados y poco significativos. Por otro lado, los resultados del test secuencial de la rutina DISTLM han revelado como explica cada variable la variabilidad de la matriz distancia de bacterias filamentosas, corroborando los resultados de BVSTEP respecto a la singularidad biológica de cada uno de los biorreactores. A modo de ejemplo y centrando la atención en las variables OPE, la EF y CM definen la mayor variabilidad biológica en la EDAR CX y DN, respectivamente, mientras que en QB, CT1 y CT2 lo hacen el TRHds, la CO₃ y los SSLM, respectivamente. Además, también a partir del test secuencial se ha demostrado (igual que en BVSTEP) que construir modelos de interpretación ambiental a partir de la matriz total, así como no categorizar variables causa la pérdida de información ambiental, repercutiendo en un descenso de la variación biológica explicada correspondiente a la comunidad de bacterias filamentosas. Por todo ello, nuestra estrategia se ha centrado en la construcción e interpretación de modelos de regresión lineal múltiple multivariante basados en la distancia (DISTLM-dbrDA) a partir de la información aportada principalmente por cada uno de los biorreactores, seleccionando el mínimo número de variables ambientales que explican el mayor porcentaje de la variabilidad biológica, siguiendo el principio de parsimonia estadística. La superposición del gráfico de burbujas (*bubble plots*) en el dbrDA nos ha permitido asociar rangos ambientales a las distintas bacterias filamentosas, obteniendo una información valiosa para el conocimiento de su dinámica poblacional.

A continuación se discuten los resultados de asociación obtenidos entre la comunidad de bacterias filamentosas y las variables ambientales en los biorreactores estudiados, así como su interpretación ecológica, comparando dichos resultados con los datos de ecofisiología *in situ* y los principales estudios de ecología en EDAR a escala real publicados hasta el momento. Además, se comparan los resultados de asociación obtenidos empleando la técnica FISH con aquellos correspondientes a partir del método convencional.

Bacterias filamentosas *Nostocoida limicola*

La bacteria filamentosa *Nostocoida limicola* fue descrita por primera vez por Van Veen en 1973, aislada de fangos activos y caracterizada como Gram positiva, con forma de cocos en cadenas, crecimiento lento y sin motilidad. Años más tarde se consideró que esta bacteria se constituía en tres morfotipos diferenciados: *Nostocoida limicola* I, *Nostocoida limicola* II y *Nostocoida limicola* III (Eikelboom & Van Buijsen, 1983).

Aunque un gran número de estudios en EDAR de Europa han demostrado la distribución de bacterias *N. limicola* (Wanner *et al.*, 1998; Seviour & Blackall, 1999; Alonso *et al.*, 2009), han sido escasos los esfuerzos empleados en la distinción entre los tres morfotipos, afirmando hasta no hace demasiados años que probablemente se trataba de una

única especie de bacteria distribuida en tres variantes diferenciadas según el tamaño celular (Jenkins *et al.*, 2004). Dicha afirmación ya había sido cuestionada anteriormente por Liu & Seviour (2001), puesto que los tres morfotipos engloban bacterias no relacionadas y con características fisiológicas diferentes (Kragelund *et al.*, 2005, 2006; Seviour *et al.*, 2008; Nielsen *et al.*, 2009a).

Con el empleo de las técnicas moleculares se ha ido resolviendo parte de la problemática sobre la situación filogenética de *Nostocoida limicola*. Los tres morfotipos en realidad se distribuyen en cinco fila distintos: filo *Proteobacteria* clase *Alfaproteobacteria* (Snaidr *et al.*, 2002), filo *Chloroflexi* (Schade *et al.*, 2002), filo *Firmicutes* (Liu *et al.*, 2000), filo *Planctomycetes* (Liu *et al.*, 2001) y filo *Actinobacteria* (Blackall *et al.*, 2000; Liu & Seviour, 2001).

Bacterias *Nostocoida limicola* I. Por su bajo contenido en guanina y citosina se localiza filogenéticamente dentro del filo *Firmicutes* (Liu *et al.*, 2000). Aunque este filo contiene miembros pertenecientes a los géneros *Trichococcus* y *Streptococcus*, el estudio de su metabolismo, crecimiento y secuenciación del 16S rRNA sitúa a las bacterias aisladas de *N. limicola* I dentro del género *Trichococcus* (Liu & Seviour, 2001), estando muy relacionadas y cercanas a *Trichococcus flocculiformis* (Scheff *et al.*, 1984) y a *Trichococcus pasteurii* (Liu *et al.*, 2002), conocida previamente como *Lactosphaera pasteurii* (Janssen *et al.*, 1996).

Entre los resultados interesantes encontrados en el presente trabajo se encuentra la identificación del género *Trichococcus* como agregados de células en forma de cocos, aunque se han encontrado localizados principalmente dentro del flóculo. De forma común los filamentos se han presentado en cadenas celulares cortas, tal y como ha sido descrito por Liu & Seviour (2001), además de presentar una reacción positiva a las reacciones de Gram y Neisser. Dicha bacteria se ha encontrado muy abundante en los biorreactores estudiados (QB, CXAB, CXCD y DN), siendo necesario el empleo de las reacciones Gram y Neisser para su identificación convencional.

Bacterias *Nostocoida limicola* II. *N. limicola* II es sin duda el morfotipo más particular de los tres, debido principalmente a su diversidad filogenética. En nuestro estudio han sido identificadas cuatro bacterias *Nostocoida limicola* afiliadas a tres fila diferentes: *Ca. 'Alysiosphaera europaea'* y *Ca. 'Monilibacter batavus'* (filo *Proteobacteria*), *Nostocoida limicola* II (AHW183) (filo *Chloroflexi*) y *Tetrasphaera japonica* (filo *Actinobacteria*). La secuenciación del 16S rRNA de los aislados Ben (EDAR de Bendigo en Australia) muestra que forman un clúster definido dentro del grupo de bacterias Gram positivas con alto contenido en guanina y citosina, situándose dentro de las actinobacterias (Blackall *et al.*, 2000). Morfológicamente, comparten propiedades con los cocos no filamentosos del género *Tetrasphaera*, permitiendo situarlos como al menos cinco especies candidatas distintas dentro de este género (Maszenan *et al.*, 2000; McKenzie *et al.*, 2006). Por otra lado, aislados del mismo morfotipo indistinguibles al microscopio óptico han resultado pertenecer al filo *Chloroflexi* (Schade *et al.*, 2002) y a la clase *Alfaproteobacteria* (Snaidr *et al.*, 2002).

La frecuencia de aparición de las cuatro bacterias filamentosas *N. limicola* II han mostrado elevados porcentajes de ocurrencia en los biorreactores estudiados. En este sentido, nuestros resultados estarían de acuerdo con la frecuencia de aparición encontrada por algunos autores, indicando que dichas bacterias filamentosas son comunes dentro de las comunidades de microorganismos filamentosos del fango activo (Seviour *et al.*, 2000; Beer *et al.*, 2002; Björnsson *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2009a). De hecho, *Tetrasphaera japonica* ha sido muy común durante todo el periodo de estudio en el conjunto total de los biorreactores, corroborando la abundancia y dominancia encontrada por Seviour *et al.* (2006, 2008). Dicha bacteria *N. limicola*, junto con *Trichococcus*, ha sido observada con poca frecuencia pero en ocasiones con elevada densidad absoluta en plantas de Europa (Maszenan *et al.*, 2000; Eikelboom & Geurkink, 2002). Algunos autores sugieren que la bacteria *N. limicola* II filo *Chloroflexi* (AHW183) es poco frecuente en fangos activos (Nielsen *et al.*, 2009a), mientras que en nuestro estudio se ha observado de forma abundante en los biorreactores CXAB y CXCD. Por último, *Ca. 'Molinibacter batavus'* y *Ca. 'Alysiosphaera europaea'* han mostrado diferente composición relativa en los distintos biorreactores, lo que podría confirmar las observaciones de algunos autores sobre la distinta ecofisiología que pueden presentar algunas bacterias filogenéticamente muy relacionadas (Levantesi *et al.*, 2004; Kragelund *et al.*, 2009).

Bacterias *Nostocoida limicola* III. La secuenciación de los 16S rRNA de algunos aislados o cepas Ben sitúan a los miembros agrupados en este morfotipo dentro del filo *Planctomycetes*, hibridando con la sonda PLA-46, característica de este grupo (Neef *et al.*, 1998). Su alto contenido en guanina y citosina los sitúa cercanos a *Isosphaera pallida* (Giovannoni *et al.*, 1987), aunque son diferentes fenotípicamente a esta especie (Liu *et al.*, 2001). Otros estudios de secuenciación señalan que estas bacterias pueden aparecer en fangos activos como cocos aislados o agregados, dificultando su identificación mediante microscopía convencional. Dicha característica puede llevar a subestimar su frecuencia de aparición, lo que apoya la teoría de que algunas de estas bacterias del género *Isosphaera* no hubieran sido descritas previamente (Seviour *et al.*, 2002). Uno de los resultados interesantes de nuestro estudio, de la misma forma que para *Trichococcus* sp., ha sido la identificación de *Isosphaera* sp. como agregados de células en forma de cocos individualizadas en la EDAR DN, lo que confirma las observaciones de Neef *et al.* (1998) sobre la morfología de esta bacteria en el fango activo.

El presente estudio es el primero desde nuestro conocimiento que ha empleado el mayor número de sondas moleculares para la identificación de bacterias filamentosas *N. limicola*, relacionándolas con las variables ambientales de instalaciones a escala real. Por ello, la discusión de los resultados obtenidos se centrará principalmente en la comparación e integración de dichos resultados con los obtenidos en los diferentes estudios de ecofisiología *in situ*. Además, nuestros resultados han permitido describir las limitaciones en la identificación convencional del morfotipo *N. limicola* II, concluyendo que la técnica FISH es la adecuada para su identificación y cuantificación (Calvo *et al.*, 2016).

▪ ***Trichococcus* sp. (*Nostocoida limicola* I)**

Las descripciones de Eikelboom (2000, 2006) y Jenkins *et al.* (2004) sobre el morfotipo *N. limicola* I son bastante confusas, sin alcanzar un criterio común respecto a la forma y dimensiones de las células y filamentos. Mientras que Jenkins *et al.* (2004) lo describen como filamentos de longitud entre 40-100 μm , células ovales de 0,8-1,0 μm de diámetro y septos claramente visibles, Eikelboom (2000, 2006) lo describe como filamentos de longitud <200 μm y células con forma discoidal o esféricas de 0,6-0,8 μm de diámetro y septos apenas visibles. Por otro lado, Seviour *et al.* (2010) describe a *Trichococcus flocculiformis* (*Nostocoida limicola* I) como un filamento de diámetro 1-1,5 μm en forma de cadenas de células (cocos) con septos y constricciones claramente visibles. Nuestras observaciones sugieren que los filamentos identificados de forma convencional en nuestro estudio parecen corresponderse más con la descripción de Jenkins *et al.* (2004). Además, los resultados han permitido demostrar que los filamentos hibridados con la sonda NLIMI91, específica para el género *Trichococcus*, parecen no corresponderse con algunas formas asociadas al morfotipo *N. limicola* I. Por ello, nuestras observaciones estarían de acuerdo con Eikelboom (2006), el cual señala que la identificación de bacterias *N. limicola* I a través de la técnica FISH todavía es incompleta. Por tanto, consideramos que las características ecológicas atribuidas a nivel convencional deberían ser cuestionadas debido fundamentalmente a la aparente diversidad de dicho morfotipo. Hasta el momento, los organismos que pueden ser detectados mediante la sonda NLIMI91 son: Ben 200, 201, 202, 205, 206, 77, 78, *T. flocculiformis*, *L. pasteurii* y *C. allantoicus* (Seviour *et al.*, 2002).

Ante la ausencia de estudios de ecofisiología *in situ* correspondientes a las bacterias *Nostocoida limicola* I, se encuentran disponibles los datos de fisiología obtenidos de *T. flocculiformis* en cultivo puro. Además, hasta el momento no ha sido descrita la ecología de las bacterias hibridadas con la sonda NLIMI91 (*Trichococcus* sp.), siendo la primera vez que se estudia su dinámica poblacional a partir de las variables de control de planta.

En nuestro estudio, la abundancia de *Trichococcus* sp. estaría influenciada por valores de la EF inferiores a 10 días. Estos resultados serían contrarios a la influencia de la baja CM asociada (0,05-0,1 Kg DBO₅/Kg SSLM.d) a *N. limicola* I, descrita por algunos autores (Eikelboom, 2006). Por otro lado, los elevados valores del TRHds asociados en QB (por encima de 6 horas), así como los elevados valores asociados de ODb y ODa en la primera y tercera posición de medición del OD en DN, podrían ser consistentes con su capacidad de degradación de distintos compuestos en condiciones anóxicas y óxicas, tal cual se ha determinado en cultivo puro de *T. flocculiformis* por algunos autores (Liu *et al.*, 2002). Por otro lado, el morfotipo *N. limicola* I parece mostrar cierta sensibilidad a la aplicación de la CO₃ en CT, asociándose además a partir de la matriz total con valores del TRHr inferiores a 10 horas.

La influencia de valores de CondLM por encima de 2000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (correspondiéndose con elevada CM) en QB, así como los valores del NTLM por encima de 100 mg/g SSVLM en el caso de CX, sería consistente con los bajos valores de EF con los cuales se ha relacionado *Trichococcus* sp. en CX. Por otro lado, los valores de $T^{\text{a}}\text{r}$ por encima de 20 °C parecen influir en la mayor abundancia tanto de *Nostocoida limicola* I como de *Trichococcus* sp. en CT y DN, respectivamente, estando de acuerdo con el crecimiento óptimo entre 25-30 °C de *T. flocculiformis* (Liu *et al.*, 2002) y en desacuerdo con la baja $T^{\text{a}}\text{r}$ asociada por Wang *et al.* (2015).

Respecto a las variables FQAF, la influencia de valores elevados de la CAG y CNT en QB en la abundancia de *Trichococcus* sp., así como valores también elevados de la CPT y CCarb en CX, serían consistentes con la elevada CondLM asociada en QB y la baja EF en el caso de CX. La elevada CAG asociada sería consistente con la hipótesis de Wang *et al.* (2015), respecto a la posible hidrofobicidad de la pared celular de *Trichococcus* sp., al ser más abundante en las espumas biológicas. La influencia de las variables FQAF parece ser menos acusada en el caso de *N. limicola* I, asociándose con elevado %DQOs y CAG en QB y CX, respectivamente.

Respecto a la asociación con los componentes del nitrógeno, tanto *Trichococcus* sp. como *N. limicola* I no parecen encontrarse influenciados por la presencia de determinados aceptores de electrones y/o rendimientos del nitrógeno, exceptuando la moderada relación encontrada entre *N. limicola* I y el bajo rN-NH₄⁺ en QB.

A partir de todo lo expuesto anteriormente, nuestras observaciones sugieren que la dinámica poblacional de *Trichococcus* sp., hibridada con la sonda NLIMI91, se encuentra de forma general influenciada por la elevada carga del afluente y la baja EF. Hasta el momento son escasos los estudios concluyentes que relacionen dicho microorganismo filamentoso con las variables ambientales de EDAR a escala real (Wang *et al.*, 2015). Por último, insistimos en la necesidad de continuar estudiando la diversidad filogenética de *N. limicola* I, con el fin de poder avanzar en el conocimiento de sus características ecológicas.

▪ ***Ca.* ‘*Monilibacter batavus*’ y *Ca.* ‘*Alisiosphaera europaea*’**

Los microorganismos filamentosos miembros de la clase *Alfaproteobacteria* son muy frecuentes en fangos activos, siendo reconocidos hasta el momento seis filotipos con apariencia similar a los morfotipos *Nostocoida limicola* y tipo 021N (Nielsen *et al.*, 2009a). La ecofisiología *in situ* de dichos filotipos se encuentra ampliamente descrita por Kragelund *et al.* (2006) y revisada por Nielsen *et al.* (2009a), siendo divididos en dos grupos: el grupo I, como consumidores primarios de ácidos grasos de cadena corta, en el cual se encuentra *Ca.* ‘*Monilibacter batavus*’, y el grupo 2, como consumidores además de ciertos carbohidratos, aminoácidos y etanol, donde se encuentra *Ca.* ‘*Alisiosphaera europaea*’. En general, son organismos nutricionalmente versátiles, los cuales prefieren sustratos solubles para su crecimiento, y por ello, no suelen expresar actividad exoenzimática (Kragelund *et al.*, 2006). Nuestro

objetivo principal se ha centrado principalmente en corroborar si la diferenciación ecofisiológica entre ambos grupos, a través de *Ca. 'M. batavus'* y *Ca. 'A. europaea'*, se corresponde con diferencias en su dinámica poblacional.

Los resultados obtenidos a partir del modelo lineal de CX han revelado que ambas microorganismos parecen encontrarse influenciados por diferentes valores de la EF, encontrándose mayor abundancia de *Ca. 'A. europaea'* cuando los valores de EF fueron mayores de 10 días, y menores en el caso de *Ca. 'M. batavus'*. Por otro lado, el comportamiento de *Ca. 'M. batavus'* se ha mostrado muy similar al de *Trichococcus* sp. en el biorreactor DN respecto a su relación con el OD disponible, asociándose con valores elevados del ODb y ODa en la primera y tercera posición (P1 y P3), respectivamente. Estos resultados podrían ser consistentes con la capacidad de *Ca. 'M. batavus'* de asimilar sustratos en condiciones anóxicas (utilizando NO_3^- y NO_2^-) y aerobias (Kragelund *et al.*, 2006).

Respecto a las variables FQLM en CX, los resultados han revelado también diferente comportamiento entre ambas candidatas, relacionándose *Ca. 'M. batavus'* con valores elevados del NTLM y bajos en el caso de *Ca. 'A. europaea'*.

Los resultados obtenidos a partir del modelo lineal de variables FQAF de CX han permitido también encontrar diferencias entre ambos microorganismos, asociándose en el caso de *Ca. 'M. batavus'* con valores elevados de la CPT y CCarb. A partir de nuestras observaciones, una posible justificación sobre la influencia de la baja EF y elevada carga afluente en la mayor abundancia de *Ca. 'M. batavus'* podría ser debida a su escasa versatilidad en la asimilación de sustratos solubles (Kragelund *et al.*, 2006). En este sentido, una disminución de la EF o un incremento de la carga afluente podría asociarse a un aumento de la disponibilidad de diversos sustratos asimilables por los microorganismos filamentosos, siendo por tanto competitivos aquellos con una menor versatilidad en la asimilación de sustratos orgánicos, como por ejemplo *Ca. 'M. batavus'*. Por esta razón, podría explicarse la mayor abundancia de *Ca. 'A. europaea'* en el biorreactor DN, el cual presentó los valores más bajos de CM, mientras que la mayor abundancia de *Ca. 'M. batavus'* en CX se justificaría con la mayor CM y baja EF.

Respecto a la relación con los componentes del nitrógeno, *Ca. 'M. batavus'* parece asociarse a la inestabilidad en el proceso de nitrificación de CX, asociándose con valores elevados del N-NH_4^+ y $\% \text{N-NO}_2^-$ en el efluente, mientras que *Ca. 'A. europaea'* ha mostrado una relación inversa. La influencia de esta última variable estaría de acuerdo con la capacidad de *Ca. 'M. batavus'* de asimilar sustratos (piruvato y acetato) en presencia de N-NO_2^- , respecto a la falta de evidencia en el caso de *Ca. 'A. europaea'*. Los resultados obtenidos a partir del modelo lineal de la matriz total confirman la relación de *Ca. 'A. europaea'* con la estabilidad del proceso de nitrificación (elevado rNKTs), mientras que *Ca. 'M. batavus'* parece mostrar una relación inversa (bajo coeficiente de correlación). La relación directa encontrada con el rNTs a partir de la matriz total no ha sido considerada relevante, puesto que se ha obtenido en un eje con baja variación explicada (dbRDA3).

En base a todo lo expuesto anteriormente, nuestros resultados son concluyentes respecto a la diferente dinámica poblacional de ambos microorganismos filamentosos, y por lo tanto, distinta interpretación ecológica en la explotación de las EDAR. Efectivamente, la inclusión de *Ca.* 'M. batavus' y *Ca.* 'A. europaea' en dos grupos distintos de microorganismos filamentosos de la clase *Alfaproteobacteria* (grupos I y II) a partir de los resultados obtenidos de su ecofisiología *in situ*, parecen corresponderse a lo largo del tiempo en plantas depuradoras a escala real, asociándose *Ca.* 'M. batavus' a elevada carga del afluente y baja EF y *Ca.* 'A. europaea' a valores inversos.

▪ ***Nostocoida limicola* II filo *Chloroflexi***

La sonda AHW183 fue diseñada para la identificación de un morfotipo *Nostocoida limicola* perteneciente al filo *Chloroflexi* (Shade *et al.*, 2002) en fangos activos procedentes de EDAR urbanas, siendo poco frecuente su presencia en las EDAR (Nielsen *et al.*, 2009a). Eikelboom (2006) propone cuatro morfotipos *Nostocoida limicola*, afiliando el IV morfotipo a la sonda AHW183. Hasta el momento se desconoce tanto su ecología como su ecofisiología *in situ*, siendo los resultados obtenidos en el presente estudio probablemente los primeros en aportar algunas características ecológicas.

Los resultados obtenidos a partir del modelo lineal de CX nos ha permitido revelar una correlación muy elevada de *N. limicola* II (AHW183) con valores de EF inferiores a 10 días. Además, dicho microorganismo parece mostrar cierta resistencia a la anoxia al relacionarse en QB con valores elevados del TRHds.

Respecto a las variables FQLM, *N. limicola* II (AHW183) se ha asociado en QB a valores de la CondLM superiores a 2000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, relación que sería consistente con la baja EF asociada en CX. Por otro lado, y de la misma forma que *Ca.* 'M. batavus', se ha asociado con valores elevados del NTLM.

Los valores elevados de la CAG y CNT relacionados en QB parecen influir en la mayor abundancia de *N. limicola* II (AHW183), mientras que valores elevados de la CPT y CCarb lo hacen en CX. Por ello, nuestras observaciones indican que dicho organismo parece relacionarse con elevadas cargas del afluente.

Respecto a los componentes del nitrógeno, valores del N-NO_2^- superiores a 1 mg/L en QB y valores del $\% \text{N-NO}_2^-$ superiores al 7% en CX podrían explicar la presencia *N. limicola* II (AHW183) por asimilación de sustrato en presencia de nitritos. Su elevada relación con el amonio del efluente en CX, así como los bajos valores asociados del rNKTs, parece indicar que dicho organismo se encuentra asociado a bajos rendimientos del proceso de nitrificación.

En resumen, la dinámica poblacional de *N. limicola* II (AHW183) se ha mostrado muy similar a *Ca.* 'M. batavus', al relacionarse con elevada carga del afluente, baja EF e inestabilidad del proceso de nitrificación.

▪ ***Candidatus* ‘Nostocoida limicola II’, aislado Ben 70 (*Tetrasphaera* sp.)**

Algunas bacterias filamentosas *N. limicola* pertenecientes al filo *Actinobacteria* han sido descritas como miembros del género *Tetrasphaera* dentro de la familia *Intrasporangiaceae* (McKenzie *et al.*, 2006). Existen algunos aislados *N. limicola* II (Blackall *et al.*, 2000) y sondas de oligonucleótidos para su identificación mediante la técnica FISH (Liu & Seviour, 2001). Hasta el momento han sido identificadas dos bacterias *N. limicola* II dentro de este filo: NLIMIII175 y NLIMIII192. La primera sonda hibridaría con todos los aislados excepto el Ben 70, posicionando dichos aislados dentro de *Tetrasphaera jenkinsii* sp. nov. y *Tetrasphaera veronensis*, mientras que la segunda sonda hibridaría con el aislado Ben 70 posicionándolo dentro de *Tetrasphaera vanveenii* sp. nov. (McKenzie *et al.*, 2006). Este último aislado se ha relacionado estrechamente con los cocos *Tetrasphaera japonica* (Maszenan *et al.*, 2000), de ahí la denominación empleada en el presente estudio para la sonda NLIMIII192. Los resultados sobre la fisiología en cultivos puros y ecofisiología de dichos aislados se encuentra principalmente recogida en Blackall *et al.* (2000) y Seviour *et al.* (2006), respectivamente. En nuestro trabajo ha sido estudiada la dinámica poblacional de la bacteria *T. japonica* (NLIMIII192), la cual se ha mostrado muy frecuente en los cuatro biorreactores estudiados (QB, CXAB, CXCD y DN).

Los resultados obtenidos a partir del modelo lineal de variables OPE de QB han revelado que la población de *T. japonica* aumenta con el incremento de los valores del TRHds. Dicha asociación podría indicar que tiempos prolongados de ausencia de oxígeno no parecen afectar a su dinámica poblacional, observación que ha podido ser contrastada con el elevado valor del ODb asociado en el primer reactor de DN, además de la relación encontrada con elevado ODa en el tercer reactor. Todo ello parece indicar que *T. japonica* podría encontrarse favorecida en distintos ambientes, estando de acuerdo con su capacidad de asimilación de sustratos en condiciones aeróbicas, anóxicas y anaeróbicas determinadas en estudios de ecofisiología *in situ* (Seviour *et al.*, 2006). A diferencia del resto de bacterias *N. limicola* II, la EF no parece influir en su dinámica poblacional.

Respecto a las variables FQLM, los resultados obtenidos a partir del modelo lineal de QB han revelado que *T. japonica* se ha mostrado influenciada por los valores elevados de la T^a_r y CondLM, indicando una relación con la elevada carga del afluente. La asociación observada con la T^a_r sería contraria a la encontrada por Jiang *et al.* (2016), los cuales asocian *Nostocoida limicola* II *Tetrasphaera* con baja T^a_r . Estos datos contradictorios podrían justificarse a partir del amplio rango de temperatura (15-30 °C) en el cual son capaces de crecer las bacterias candidatas *N. limicola* II (Blackall *et al.*, 2000).

Los valores elevados de la CAG y CNT en QB parecen influir en la mayor abundancia de *T. japonica*, de la misma forma que *N. limicola* II (AHW183). Por tanto, nuestras observaciones indican que dicho organismo parece relacionarse con elevadas cargas del afluente.

Por último, los rendimientos de eliminación del nitrógeno y la concentración de determinados componentes del nitrógeno no parecen relacionarse con la abundancia de *T. japonica*, a pesar de que Jiang *et al.* (2016) han relacionado a partir del análisis metagenómico a *Nostocoida limicola* II *Tetrasphaera* con valores elevados del N-NH₄⁺ en el tanque de aireación.

Nuestros resultados sobre las bacterias *Nostocoida limicola* II nos han permitido concluir que la dinámica poblacional de *Ca.* 'A. europaea' es muy diferente al resto (*Ca.* 'M. batavus', *N. limicola* II-*Chloroflexi* y *T. japonica*), encontrándose influenciada la primera por elevados valores de la EF, bajas cargas del afluente y asociándose a buenos rendimientos de eliminación del nitrógeno. El resto de bacterias *N. limicola* II parecen encontrarse influenciadas por valores contrarios, destacando la ausencia de relación de *T. japonica* con la EF y los rendimiento del nitrógeno. Nuestros resultados serían consistentes con la asociación del morfotipo *Nostocoida limicola* II a un amplio rango de la EF (2,5-45 días) y la CM (0,6-0,06 Kg DBO₅/Kg SSLM.d) (Jenkins *et al.*, 2004), teniendo en cuenta que las bacterias *N. limicola* II pueden encontrarse influenciadas por diferentes rangos de ambas variables. Por todo ello, nuestros resultados ponen de manifiesto una vez más la necesidad del empleo de técnicas moleculares para la identificación de bacterias *Nostocoida limicola* II durante los episodios de *bulking*.

▪ ***Isosphaera* sp. (*Nostocoida limicola* III)**

Hasta el momento, se han aislado cinco cepas de bacterias filamentosas *Nostocoida limicola* III en cultivos puros a partir de muestras de fangos activos de EDAR en Australia (Liu *et al.*, 2001). A partir de dichos aislados ha sido posible el diseño de tres sondas de oligonucleótidos para la identificación, mediante la técnica FISH, de las bacterias filamentosas que se engloban dentro del morfotipo convencional *Nostocoida limicola* III (Liu & Seviour, 2001). La especificidad de dichas sondas es la siguiente: NLIMIII 301 (Ben 220, 222, 223, 224, 225), NLIMIII 729 (Ben 220) y NLIMIII 830 (Ben 222, 223, 224, 225). En nuestro estudio ha sido utilizada la sonda NLIMIII mix, compuesta por la mezcla de las tres sondas anteriores, para la identificación de todas las bacterias *N. limicola* III. Los estudios sobre su fisiología son muy escasos (Liu & Seviour, 2001; Liu *et al.*, 2001), mientras que hasta el momento no hay documentados resultados sobre su ecología en plantas depuradoras a escala real.

Las bacterias correspondientes a *Isosphaera* sp. se han encontrado en menor abundancia que las bacterias filamentosas correspondientes al morfotipo *N. limicola* II, observándose la mayor abundancia en el biorreactor QB. Los resultados obtenidos a partir del modelo lineal de variables OPE del biorreactor QB han revelado que *Isosphaera* sp. parece encontrarse adaptada a elevados valores del TRHds, siendo el microorganismo que mayor coeficiente de correlación ha mostrado. El modelo lineal de DN ha revelado un comportamiento contrario al resto de bacterias *Nostocoida limicola*, asociándose de una forma moderada con bajo ODb y ODa, no siendo concluyentes los resultados.

En el caso de las variables FQLM, *Isosphaera* sp. ha mostrado una fuerte correlación con valores elevados de CondLM, encontrándose influenciada por la alta carga del afluente. Dicha asociación estaría de acuerdo con la relación encontrada con valores elevados de la CAG y CNT en QB. Por último, la abundancia de *Isosphaera* sp. se ha mostrado favorecida por valores bajos de la T^r, estando de acuerdo con la asociación encontrada en el caso del morfotipo *N. limicola* III por algunos autores (Eikelboom, 2000).

Respecto a los componentes del nitrógeno, su relación con valores del N-NO₂⁻ superiores a 1 mg/L en QB podrían explicar su presencia debido a la asimilación de sustrato en presencia de nitritos en el reactor. Por otro lado, la relación con el N-NH₄⁺ en el efluente encontrada a partir del modelo lineal de la matriz total (QB+CX+DN) parece indicar que dicho organismo podría relacionarse con bajos rendimientos del proceso de nitrificación, lo cual sería consistente con la elevada carga asociada en QB.

En nuestro estudio, la identificación convencional del morfotipo *Nostocoida limicola* III incluye aquellos tradicionalmente clasificados como *N. limicola* II y *N. limicola* III, según las recomendaciones de Eikelboom (2000). La relación encontrada entre *N. limicola* III (convencional) y las variables ambientales estudiadas en el presente trabajo ha sido similar a la encontrada para la mayoría de bacterias *N. limicola* II y III (*Ca.* 'Monilibacter batavus', *N. limicola* II filo *Chloroflexi*, *T. japonica* e *Isosphaera* sp.), es decir, alta carga del afluente, baja EF y bajos rendimientos de eliminación del nitrógeno. Ambas relaciones coinciden puesto que solo *Ca.* 'Alysiosphaera europaea' ha mostrado un comportamiento contrario al resto, lo cual pone de manifiesto que la identificación convencional de *Nostocoida limicola* II y III (Eikelboom, 2000 y Jenkins *et al.*, 2004) puede conducir inevitablemente a errores y confusión entre responsables de planta a la hora de la toma de decisiones ante episodios de *bulking* y/o *foaming*. Por último, indicar que las bacterias *Nostocoida limicola* identificadas en nuestro trabajo no han mostrado un crecimiento excesivo de filamentos que desencadenaran en episodios de *bulking* y/o *foaming*. Por ello, aunque en condiciones normales de crecimiento parezcan mostrar un patrón de distribución similar, no implica que ante determinadas situaciones en planta (vertidos, reboses internos, etc.) puedan desarrollar diferentes estrategias competitivas que revelen diferencias significativa entre las bacterias *N. limicola* respecto a las variables ambientales.

Bacterias filamentosas del grupo *Thiothrix nivea* y tipo 021N de Eikelboom

El género *Thiothrix* pertenece a la familia *Thiothrichaceae* dentro de la clase *Gammaproteobacteria* (Cole *et al.*, 2005), e incluye un grupo importante de bacterias que oxidan compuestos reducidos del azufre en fangos activos (Eikelboom & van Buijsen, 1983; Jenkins *et al.*, 1993). La implicación del género *Thiothrix* en episodios de *bulking* ha dado lugar al estudio de su fisiología (Richard *et al.*, 1985; Williams & Unz, 1985, b; Tandoi *et al.*, 1994; Aruga *et al.*, 2002; Rossetti *et al.*, 2003), estructura (Williams *et al.*, 1987; Brigmon *et al.*, 1994b), crecimiento (Williams & Unz, 1989) y relación con metales pesados (Shuttleworth & Unz, 1991, 1993).

Desde la primera descripción de *Thiothrix* sp. por Winogradsky en 1888 (Larkin, 1989), han sido reconocidas siete especies y algunos estudios han centrado sus objetivos en resolver en detalle su filogenia (Howarth *et al.*, 1999; Kanagawa *et al.*, 2000; Aruga *et al.*, 2002). En base a los datos filogenéticos, las especies de *Thiothrix* han sido divididas en dos grupos principales (Aruga *et al.*, 2002): el grupo *Thiothrix nivea* y el grupo tipo 021N de Eikelboom. El grupo *Thiothrix nivea*, el cual incluye *T. nivea*, *T. unzii* y *T. fructosivorans*, muestra el 88,3-92% de similaridad de la secuencia del gen 16S rRNA con el grupo tipo 021N de Eikelboom, el cual incluye *T. disciformis*, *T. eikelboomii* y *T. flexilis*. La especie *Thiothrix deflavii* se encuentra estrechamente relacionada a nivel filogenético con los aislados *T. flexilis* del grupo tipo 021N de Eikelboom, con un 96,8-97,1% de similaridad de la secuencia del gen 16S rRNA. Sin embargo, dicha especie no ha sido considerada miembro del grupo tipo 021N de Eikelboom (Aruga *et al.*, 2002). Los nombres ‘*Thiothrix ramosa*’ (perteneciente al grupo *Thiothrix nivea*) y ‘*Thiothrix arctophila*’ no han sido publicados de forma válida y el aislado CT3 no ha recibido un nombre de especie (Tandoi *et al.*, 1994), siendo todavía incierta la situación taxonómica de dichos organismos (Unz & Head, 2005). Los últimos estudios sobre especies aisladas del género *Thiothrix*, en este caso a partir de manantiales de aguas sulfurosas, proponen dos nuevas candidatas: *Thiothrix caldifontis* sp. nov. y *Thiothrix lacustris* sp. nov., ambas estrechamente relacionadas con *Thiothrix fructosivorans* (Chernousova *et al.*, 2009).

Nuestros resultados sobre la identificación convencional vs. FISH de bacterias del grupo *T. nivea* y tipo 021N de Eikelboom nos han permitido constatar que los resultados de la microscopía convencional no son comparables con aquellos obtenidos a partir de la técnica FISH (Zornoza *et al.*, 2016b). Por ello, a continuación se discute aquellas asociaciones obtenidas a partir de la técnica FISH para *Thiothrix nivea* y *Thiothrix fructosivorans*, puesto que debido a la baja abundancia observada de *T. eikelboomii* no ha sido posible encontrar asociaciones significativas.

- ***Thiothrix nivea* y *Thiothrix fructosivorans***

Nuestras observaciones sobre la abundancia de *Thiothrix nivea* y *Thiothrix fructosivorans* mostraron en general bajos valores de abundancia, siendo los mayores los correspondientes a los biorreactores QB y DN, respectivamente, y sin llegar a ser codominantes. Algunos autores señalan que *T. nivea* requiere para su crecimiento compuestos inorgánicos reducidos del azufre, mientras que *T. fructosivorans* no siempre los requiere (Larkin & Shinabarger, 1983; Williams & Unz, 1985a; Howarth *et al.*, 1999). Durante la identificación convencional y valoración de la abundancia de los distintos microorganismos filamentosos se observaron abundantes gránulos de azufre *in situ* en los filamentos de *T. nivea*, mientras que no fue así en el caso de *T. fructosivorans*. Por todo ello, nuestras observaciones parecen estar de acuerdo con los resultados obtenidos por los autores citados anteriormente. Por otro lado, no hay constancia de trabajos publicados que hayan documentado la presencia de *T. fructosivorans* en fangos activos procedentes de instalaciones a escala real, no siendo detectada de forma significativa en algunos estudios empleando sondas de

oligonucleótidos, mientras que *T. nivea* ha sido detectada de forma común en fangos activos de plantas que tratan papel y residuos de tableros (Kim *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos a partir del modelo lineal de variables OPE del biorreactor DN han revelado que *T. fructosivorans* se asoció de una forma moderada con bajo ODb y ODa. A pesar de los resultados no concluyentes, los bajos valores de esta última variable podrían estar de acuerdo con los bajos requerimientos de oxígeno asociados al morfotipo *Thiothrix* por algunos autores (Eikelboom, 2000, 2006). Por otro lado, el modelo lineal resultante de la matriz total ha revelado claras diferencias entre *T. fructosivorans* y *T. nivea*, asociándose a valores elevados de SSLM y TRHr, respectivamente. Teniendo en cuenta que elevadas concentraciones de SSLM pueden encontrarse relacionados con bajos valores de la CM y que *T. fructosivorans* fue encontrada abundante en el biorreactor con menores valores de la CM (DN), parece muy probable que dicho microorganismo se encuentre influenciado por cargas débiles en el reactor. Algunos manuales de identificación convencional señalan que el morfotipo *Thiothrix* se asocia a valores de CM por encima de 0,1 Kg DBO₅/Kg SSLM.d (Eikelboom, 2000) y en el intervalo 0,1-0,75 (Jenkins *et al.*, 2004). Tal cual hemos indicado anteriormente, los resultados de identificación convencional no son comparables con los obtenidos a partir de la técnica FISH, siendo por tanto cuestionables las relaciones obtenidas en el pasado a partir de los métodos tradicionales.

El modelo lineal de variables FQLM del biorreactor DN ha permitido también observar diferencias significativas entre ambas especies de *Thiothrix*. Algunos autores han encontrado que el rango de temperatura para el crecimiento de *T. fructosivorans* se encuentra entre 4-28 °C, mientras que nuestros resultados han revelado una mayor abundancia de dicho organismo cuando la T^ar fue inferior a 20 °C. A pesar de la baja abundancia de *T. nivea* en DN, esta ha sido observada cuando los valores del IVF30 fueron bajos.

Respecto a las variables FQAF, *T. nivea* y *T. fructosivorans* han presentado una mayor abundancia en el biorreactor QB cuando los valores del %DQOs fueron elevados, a pesar de no ser relevante en el caso de esta última al presentar valores bajos de abundancia (IF=2). Nuestras observaciones estarían de acuerdo con la dependencia de sustratos solubles descrita para *Thiothrix* (TNI) a partir de sus características ecofisiológicas (Nielsen *et al.*, 2009a).

En resumen, nuestras observaciones indican que el grupo *T. nivea* probablemente se encuentre formado por especies con características ecológicas diferentes en plantas depuradoras a escala real, como es el caso de *T. nivea* y *T. fructosivorans*. Es probable que la primera se encuentre más influenciada por entrada de sustratos solubles y presencia de compuestos reducidos del azufre en el reactor y la segunda por cargas orgánicas más débiles. No obstante, aunque las características ecológicas descritas para *T. fructosivorans* en el presente trabajo sean probablemente las primeras, consideramos que son todavía insuficientes y que deberían ser corroboradas en futuros estudios.

Bacterias filamentosas tipo 0803 y tipo 0914.

El filo *Chloroflexi* fue propuesto por Garrity & Holt (2001) para denominar las bacterias verdes no del azufre, las cuales comprendían cuatro clases bien diferenciadas: *Anaerolineae*, *Dehalococcoidetes*, *Chloroflexi* y *Thermomicrobia* (Hugenholtz & Stackebrandt, 2004), siendo la más abundante en fangos activos la clase *Anaerolineae* (Hugenholtz *et al.*, 1998; Sekiguchi *et al.*, 1999; Björnsson *et al.*, 2002; Juretschko *et al.*, 2002). Recientemente se ha demostrado que la subdivisión *Anaerolineae* comprende dos clases: *Anaerolineae* y *Caldilineae*, que fueron aisladas de fango granular anaeróbico termofílico (Sekiguchi *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 2006). El filo *Chloroflexi* engloba algunos morfotipos, como son: el morfotipo 0803, 0914 y 0092.

Los morfotipos filamentosos 0803 y 0914 han sido considerados a nivel convencional dos formas de un mismo organismo (Eikelboom, 2000, 2006). Cuando un morfotipo 0803 aparecía, el tipo 0914 desaparecía y viceversa, sugiriendo que podrían ser dos formas complementarias del mismo filamento bacteriano. Contrariamente, Jenkins *et al.* (2004) consideran que se trata de dos organismos diferentes, siendo la clave identificativa en el caso del morfotipo 0914 la presencia de gránulos irregulares de azufre *in situ*. Nuestros resultados sobre la comparación entre la técnica convencional y la técnica FISH en la identificación de bacterias filamentosas tipo 0803 y 0914 nos han permitido constatar que los resultados de la microscopía convencional no son comparables con aquellos obtenidos a partir de la técnica FISH (Andújar *et al.*, 2013). Por ello, a continuación se discute aquellas asociaciones obtenidas para ambas bacterias filamentosas a partir de la técnica FISH.

▪ **Tipo 0803**

El morfotipo 0803 ha sido asociado al género *Caldilinea* dentro del filo *Chloroflexi* (Kragelund *et al.*, 2011) y no, como se había considerado previamente, en la subdivisión *Rubrivivax* de la clase *Betaproteobacteria* (Bradford *et al.*, 1996). Constituye alrededor del 20% del total de la población de bacterias filamentosas del filo *Chloroflexi*, y junto con el morfotipo 0092, componen la fracción dominante de dicho filo (Kragelund *et al.*, 2011). A partir de la micromanipulación de muestras combinadas, Kragelund *et al.* (2011) fueron capaces de obtener seis secuencias y diseñar dos sondas para la detección del tipo 0803 municipal o doméstico (T0803-0654) y tipo 0803 industrial (T0803ind-0642). Hasta el momento, no constan estudios de ecología en plantas a escala real comparando la dinámica poblacional de ambos microorganismos, siendo el presente trabajo probablemente la primera referencia. La sonda T0803-0654 (aguas domésticas) fue utilizada en el estudio llevado a cabo por Mielzareck *et al.* (2012) y Miłobędzka *et al.* (2016) sin obtener correlaciones significativas con las variables ambientales de planta, mientras que la sonda T0803ind-0642 no ha sido hasta el momento empleada en estudios de ecología en EDAR. Hasta el momento tan solo ha sido descrita la ecofisiología correspondiente a la sonda diseñada para la identificación del tipo 0803 municipal (Kragelund *et al.*, 2011), además de la relaciones con variables de planta resumidas en los manuales

de Eikelboom (2000, 2006) y Jenkins *et al.* (2004) para el morfotipo 0803, las cuales deberían ser consideradas con precaución. Nuestros resultados han mostrado una elevada abundancia del tipo 0803 urbano o doméstico y tipo 0803 industrial en todos los biorreactores, siendo la abundancia de este último probablemente debida a la entrada de aguas residuales de origen industrial a los biorreactores estudiados. Además, se han encontrado diferencias significativas entre ambos, las cuales se discuten a continuación.

Los resultados obtenidos a partir del modelo lineal de variables OPE del biorreactor QB nos han permitido observar comportamientos contrarios entre ambos filotipos, asociándose el T0803 urbano con valores bajos del TRHds y el industrial con valores elevados. Dichas observaciones podrían indicar una mayor resistencia de este último a periodos prolongados de ausencia de oxígeno. Por otro lado, la mayor abundancia del filotipo industrial en los biorreactores CXAB y CXCD parece responder a valores elevados de la CM, siendo contrarios a los descritos para el morfotipo 0803 en los manuales de microscopía convencional; inferior a 0,2 Kg DBO₅/Kg SSLM.d según Eikelboom (2000) e inferior a 0,15 Kg DBO₅/Kg SSLM.d. según Jenkins *et al.* (2004). En el caso de la EDAR CT, la dinámica poblacional de ambos filotipos se ha mostrado contraria respecto a la exposición de la carga del ozono (CO₃), mostrando probablemente el filotipo industrial una mayor sensibilidad a dicha exposición. Por último, los resultados obtenidos a partir del modelo lineal de la matriz total parecen indicar un comportamiento similar respecto a su relación con la concentración de SSLM, asociándose ambos a valores elevados.

En el caso de las variables FQLM, nuestras observaciones parecen confirmar las conclusiones obtenidas en el biorreactor QB respecto a la relación del filotipo industrial con el incremento de la carga del afluente. En este biorreactor se ha observado también un comportamiento contrario respecto a la CondLM, que en el caso del filotipo urbano se ha asociado a valores por debajo de 2000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, mientras que por encima lo ha hecho el filotipo industrial. En el caso del biorreactor CX, ambos filotipos también muestran diferencias, mientras que el urbano se encontró abundante cuando el contenido del NTLM fue bajo, probablemente debido al incremento de la EF y disminución de la CM, el industrial lo hizo cuando el PTLM fue elevado. Esta última asociación podría dar indicios de cierta actividad fosfatasa en el filotipo industrial, de la misma forma que algunos autores la han encontrado para el filotipo urbano (Kragelund *et al.* 2011). Por otro lado, la variable T^ar parece mostrar una influencia similar en ambos filotipos en los biorreactores CT y DN, mostrándose abundantes en periodos de T^ar superiores a 20 °C. Por último, los resultados obtenidos a partir del modelo lineal de variables FQLM de la matriz total no han sido considerados relevantes debido a la bajos coeficientes de correlación parcial obtenidos de las distintas variables, a excepción del PTLM y la T^ar, las cuales no han sido asociadas a ambos filotipos.

Nuestras observaciones a partir del modelo lineal de variables FQAF indican que el filotipo urbano se asoció con baja CNT y CAG (biorreactor QB), baja CPT y CCarb (EDAR CX) y baja CS²⁻ (biorreactor CT1), cuyas asociaciones

serían consistentes entre sí y estarían de acuerdo con la baja carga asociada y discutida anteriormente. La carga débil a la que parece asociarse el tipo 0803 urbano sería consistente con la elevada competitividad que le confiere su diversa capacidad exoenzimática: esterasa, glucoronidasa, lipasa, chitinasa, fosfatasa y proteasa (Kragelund *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos sobre la relación de ambos filotipos con los componentes del nitrógeno fueron similares en los biorreactores CXAB, CXCD y QB, estando de acuerdo con los discutidos anteriormente para el resto de variables. El filotipo urbano se asoció con el buen rendimiento del proceso de nitrificación, siendo abundante durante los periodos con bajos valores del %N-NO₂ y N-NH₄⁺ en el efluente de la EDAR CX y bajos del N-NO₂⁻ en QB. Dichas asociaciones estarían de acuerdo con la carga débil del afluente asociada al filotipo urbano, puesto que la baja CM en el reactor es considerada una de las variables que favorece el proceso de nitrificación (Zornoza *et al.*, 2011). Contrariamente, el filotipo industrial se asoció con elevado NTs y rNTs en la EDAR CX, lo cual podría explicar su mayor abundancia en periodos de nitrificación con rendimientos moderados. Dichas observaciones estarían de acuerdo con la mayor carga asociada en el caso del filotipo industrial.

En resumen, consideramos que nuestras observaciones sobre la relación del filotipo urbano e industrial con las variables ambientales son concluyentes respecto a sus diferentes características ecológicas. En el caso del filotipo urbano, este se encuentra influenciado por cargas débiles, y por lo tanto, con buenos rendimientos del proceso de nitrificación. En cambio, el tipo 0803 industrial muestra una dinámica poblacional distinta al urbano, presentando mayor abundancia durante los periodos con mayor carga orgánica en el afluente. En este sentido, la identificación convencional del morfotipo 0803 sería considerada incierta, y su relación con las variables ambientales cuestionable, mientras que la identificación mediante la técnica FISH permitiría al responsable de planta mayor éxito en las medidas de control ante episodios de *bulking* filamentoso.

▪ Tipo 0914

Algunos autores han afirmado que el morfotipo 0914 de Eikelboom es muy común en plantas de eliminación biológica del fósforo, donde con frecuencia es confundido con el morfotipo 0803 (Eikelboom, 2000). El morfotipo 0803 tiene muy pocos rasgos distintivos microscópicos y difiere del morfotipo 0914 solo ligeramente en el diámetro del tricoma y en la forma más rectangular de las células (Jenkins *et al.*, 2004). La secuenciación completa del gen 16S rRNA de bacterias tipo 0914 ha revelado que dicho morfotipo es un miembro del filo *Chloroflexi* dentro del subgrupo 1, donde la mayoría de los miembros de dicho filo se encuentran actualmente posicionados (Björnsson *et al.*, 2002), diseñándose dos sondas (CFX67a y CFX67b) que cubren la identificación *in situ* de este morfotipo (Speirs *et al.*, 2011). Estos últimos autores utilizaron ambas sondas para la identificación de bacterias tipo 0914 en 26 EDAR, hibridando positivamente 17 de ellas con la sonda CFX67a y tan solo 4 con la sonda CFX67b. Dichos resultados

parecen indicar que probablemente este último filotipo sea poco común en fangos activos, siendo nuestras observaciones consistentes con dichos resultados al no ser detectado a lo largo del periodo de estudio. Contrariamente, las bacterias 0914 empleando la sonda CFX67a se han mostrado muy abundantes en los biorreactores QB, CT1, CT2 y DN. Hasta el momento no constan referencias posteriores a Speirs *et al.* (2011) que relacionen dichos filotipos con variables ambientales en EDAR a escala real, siendo los resultados de asociación obtenidos en el presente trabajo probablemente los primeros.

Los resultados obtenidos a partir del modelo lineal de variables OPE en el biorreactor DN han revelado que valores bajos de la CM se corresponden con una mayor abundancia de la bacteria 0914. Nuestras observaciones estarían de acuerdo con la baja CM asociada, en este caso inferior a 0,2 Kg DBO₅/Kg SSLM.d., documentada en los manuales de microscopía convencional (Eikelboom, 2000; Jenkins *et al.*, 2004). Por otro lado, también serían consistentes con la elevada EF asociada para el filotipo CFX67a en plantas con eliminación de fósforo y/o nitrógeno (Speirs *et al.*, 2011). Además, los resultados obtenidos a partir del modelo lineal de la matriz total indicaron que la bacteria 0914 fue abundante cuando los valores de SSLM fueron elevados, lo cual parece ser consistente con la baja CM asociada.

Respecto a las variables FQLM, elevados valores de la T^{ar} en el biorreactor QB parecen contribuir al incremento de la abundancia de bacterias tipo 0914, de la misma forma que se ha observado para el filotipo 0803 urbano, aunque consideramos que todavía los resultados son insuficientes y deberían ser corroborados en futuros estudios.

Por último, el modelo lineal de variables FQAF del biorreactor QB ha revelado que la bacteria tipo 0914 fue abundante durante periodos con elevados valores del %DQOs, asociándose también a periodos con bajo rendimiento del proceso de nitrificación en el mismo biorreactor. Estos resultados serían contrarios a los obtenidos por Speirs *et al.* (2011), los cuales observaron a la bacteria 0914 en plantas eliminando nutrientes. Además, tampoco serían consistentes con la baja CM asociada en el biorreactor DN, en el cual se observaron elevados rendimientos del proceso de nitrificación. Por ello, los resultados de asociación entre la bacteria tipo 0914 y los componentes y rendimientos del nitrógeno obtenidos a partir del modelo lineal de la matriz total no conducen a ninguna conclusión, puesto que dicha bacteria se asoció tan solo a bajas concentraciones de N-NO₃⁻. En base a lo discutido anteriormente, nuestras observaciones sobre la influencia de las variables ambientales en la dinámica poblacional de la bacteria tipo 0914 son inciertas y no concluyentes, siendo interesante continuar con su estudio en plantas depuradoras a escala real.

Bacterias filamentosas tipo 0092

El morfotipo 0092, originalmente descrito por Eikelboom (1975), ha sido observado en numerosos estudios llevados a cabo en plantas depuradoras de todo el mundo, siendo identificado a través de la microscopía convencional (Martins *et al.*, 2004; Tandoi *et al.*, 2006). Este morfotipo se relaciona con un amplio rango de condiciones ambientales, entre ellas, condiciones aerobias, anaerobias y anóxicas. Además, ha sido asociado a edades del fango elevadas (>15 días) y a sistemas de eliminación del fósforo (EBPR), donde la biomasa es recirculada entre la zona anaerobia y la zona aerobia (Jenkins *et al.*, 2004). Por ello, fue clasificado por Wanner & Grau (1989) como un filamento capaz de crecer bajo condiciones anóxicas, anaerobias y aerobias. En base a la secuencia del 16S rRNA obtenida a partir de la micromanipulación de cultivos, Bradford *et al.* (1996) sugirió la inclusión del tipo 0092 dentro del filo *Bacteroidetes*, aunque bacterias con rasgos morfológicos del morfotipo 0092 no hibridaron con la sonda específica del filo (McKenzie *et al.*, 2006), lo cual induce a una posible contaminación de los experimentos de Bradford *et al.* (1996), según Speirs *et al.* (2009). A partir de las investigaciones realizadas en plantas de Australia por Speirs *et al.* (2009) se ha propuesto la inclusión del morfotipo 0092 dentro del filo *Chloroflexi*, identificándose las variantes A (sonda CFX197) y B (CFX223). Dichos autores sugieren que son necesarios más datos filogenéticos para concluir que se trata de dos taxones diferentes, sugiriendo que probablemente incluso se trate de un mismo filotipo, siendo el diámetro celular de la variante B inferior a la variante A. Investigaciones basadas en el genoma de un nuevo filamento 0092 no cultivable del filo *Chloroflexi* (filotipo B45) sugieren que se trata de uno de los microorganismos filamentosos más abundantes en fangos activos (McIlroy *et al.*, 2016). De hecho, el clon B45 se encuentra agrupado en la variante A junto con los clones A26 y B1, cuya variante según Speirs *et al.* (2009) es mucho más abundante que la B. Nuestros resultados estarían de acuerdo con las observaciones de Speirs *et al.* (2009) y McIlroy *et al.* (2016), puesto que la variante A se mostró mucho más abundante que la B en los biorreactores CXAB, CXCD y DN, no hibridando positivamente esta última en QB, CT1 y CT2.

Desde la publicación por Speirs *et al.* (2009) de las sondas para la identificación de las variantes A y B, algunos estudios han utilizado la mezcla de ambas sondas (CFXmix) para la búsqueda sin éxito de la influencia de las variables ambientales (Mielczarek *et al.*, 2012) y estudio de las diferencias en las poblaciones de bacterias filamentosas durante episodios de *bulking* y *foaming* (Milobędzka *et al.*, 2016). Por otro lado, algunos estudios han utilizado la sonda de la variante A para su comparación con la identificación convencional del tipo 0092 (Milobędzka & Muszynski, 2014). Por otro lado, Santos *et al.* (2015) empleó la sonda de la variante B (CFX223) encontrando correlaciones significativas con algunas variables ambientales, como son: el IFV, la CM y el pH. Por último, algunos estudios han identificado las bacterias tipo 0092-1 *Bellilinea* y tipo 0092-2 *Flavobacterium* en episodios de *bulking* y *foaming* empleando análisis metagenómico, sin encontrar correlaciones significativas (Guo & Zhang, 2012; Jiang *et al.*, 2016). Hasta el momento no hay constancia de referencias utilizando y comparando las sondas CFX197 y CFX223 en su relación con las

variables ambientales en EDAR a escala real, siendo probablemente el presente trabajo una de las primeras referencias. Nuestros resultados sobre la identificación convencional vs. FISH de bacterias filamentosas tipo 0092 nos han permitido comprobar que los resultados de la microscopía convencional no son comparables con aquellos obtenidos a partir de la técnica FISH (Andújar *et al.*, 2013). Además, algunos autores han demostrado que el morfotipo 0092 y *Haliscomenobacter hydrossis* se pueden confundir utilizando la técnica convencional (Miłobędzka & Muszynski, 2014). Por todo ello, a continuación se discute aquellas asociaciones encontradas entre ambas variantes y las variables ambientales.

Los resultados obtenidos a partir del modelo lineal de variables OPE de la EDAR CX indican que valores de la EF superiores a 10 días influyeron en una mayor abundancia de las variantes A y B. Nuestras observaciones estarían de acuerdo con la elevada EF asociada (>10 días) al morfotipo 0092 por algunos autores (Jenkins *et al.*, 2004). Además, la variante A se ha relacionado con valores de CM inferiores a 0,16 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d en DN, lo cual sería consistente con la alta EF asociada. Estos resultados también estarían de acuerdo con los valores de CM inferiores a 0,15 y 0,1 Kg DBO₅/Kg SSLM.d asociados al morfotipo 0092 (Eikelboom, 2000 y Jenkins *et al.*, 2004, respectivamente). Además, algunos autores han correlacionado inversamente la variante B con la CM (Santos *et al.*, 2015), lo cual parece indicar que su relación con la carga del afluente es similar a la variante A. Por último, el modelo lineal construido a partir de la matriz total corrobora las relaciones encontradas en los modelos individuales, asociándose la variante B con alta EF y TRHr, y la variante A con elevada concentración de SSLM, características ambientales que favorecen la carga débil en el reactor. Dicha capacidad de colonizar fangos activos de carga débil podrían explicar la capacidad de las variantes A y B de participar en la hidrólisis de fuentes de carbono complejas, tal cual han descrito algunos autores para el filo *Chloroflexi* (Kragelund *et al.* 2007a). Dicho papel no ha podido ser demostrado para el filotipo B45, cuya asignación taxonómica provisional es ‘Candidatus Promineofilum breve’ (McIlroy *et al.*, 2016).

Respecto a las variables FQLM, se observó que los valores más elevados de abundancia de la variante A en QB aparecieron cuando la CondLM fue inferior a 2000 $\mu\text{mS/cm}$, lo cual corrobora la baja CM asociada y discutida anteriormente. Por otro lado, el modelo lineal correspondiente al biorreactor CX nos ha permitido relacionar ambas variantes con valores elevados del NTLM, lo cual sería consistente con la elevada EF asociada. Por otro lado, la variante B ha sido relacionada en el biorreactor DN con bajos valores del IVF30, lo cual explicaría que dicho filamento se encuentre en condiciones normales principalmente en el interior del flóculo, tal cual han señalado algunos autores para el morfotipo 0092 (Eikelboom, 2000). Contrariamente, Santos *et al.* (2015) relacionaron la variante B con valores elevados del IVF, relativo al rango 36-403 mL/g, mientras que en CT fue de 85-140 mL/g. Ambas conclusiones ponen de manifiesto que probablemente la bacteria tipo 0092 variante B, además de encontrarse en el interior del flóculo, puede crecer en el espacio interflocular, dificultando la sedimentación del

fango y desencadenando episodios de *bulking*, tal cual han señalado algunos autores para el tipo 0092 (Blackbeard *et al.* 1986).

Los resultados obtenidos a partir de los modelos lineales de las variables FQAF indican que la variante A fue abundante en QB cuando los valores de la CAG y CNT fueron bajos, mientras que las variantes A y B lo hicieron en la EDAR CX con la disminución de la CPT y CCarb. Dichas asociaciones corroboran la influencia de la carga débil en ambas variantes. La escasa concentración de la materia carbonosa y/o nutrientes puede contribuir a la presencia de microorganismos filamentosos con capacidad exoenzimática, que en el caso de la variante A, los resultados fueron negativos para un número limitado de exoenzimas (McIlroy *et al.*, 2016).

Los resultados que relacionan ambas variantes con los componentes del nitrógeno fueron similares en los biorreactores CXAB, CXCD y QB, siendo consistentes con los discutidos anteriormente. Las variantes A y B se asociaron a buenos rendimientos del proceso de nitrificación, mostrándose abundantes durante periodos con bajos valores del %N-NO₂ y N-NH₄⁺ en el efluente de la EDAR CX y bajos del N-NO₂⁻ en QB. Dichas asociaciones estarían de acuerdo con la carga débil del afluente asociada a las dos variantes.

En resumen, nuestras observaciones han revelado que no existen diferencias en las características ecológicas entre las variantes A y B, coincidiendo con aquellas descritas para el morfotipo 0092 de Eikelboom.

Bacterias filamentosas *Microthrix*

La presencia excesiva de bacterias filamentosas "*Microthrix parvicella*" en fangos activos se ha asociado de forma muy común en numerosos estudios con problemas de *bulking* y *foaming*, causando graves problemas de explotación en las instalaciones de tratamiento de aguas residuales (Eikelboom & van Buijsen, 1983; Jenkins *et al.*, 1993; Martins *et al.*, 2004; Rossetti *et al.*, 2005; Wannier *et al.*, 2010). El primer cultivo puro de un aislado de "*Microthrix parvicella*" fue obtenido por van Veen (1973). Sin embargo, los filamentos estudiados por Pasveer (1969) y Farquhar & Boyle (1971a, b) fueron probablemente las primeras referencias de "*Microthrix parvicella*" y sus estudios los primeros intentos en aislar dicho organismo. Se ha conseguido aislar en cultivos puros en muy pocas ocasiones (Van Veen, 1973; Eikelboom, 1975; Slijkhuis, 1983; Blackall *et al.*, 1994; Tandoi *et al.*, 1998), siendo muy complicado su mantenimiento. El análisis filogenético de algunos de los aislados ha permitido la inclusión de "*Microthrix parvicella*", como *Candidatus* (*Ca.*), en la clase *Actinobacteria* dentro del filo *Actinobacteria*, puesto que "*Microthrix parvicella*" es el nombre vernáculo usado en la explotación de las EDAR (Blackall *et al.*, 1996). La característica ecofisiológica singular de este microorganismo es su capacidad de asimilar ácidos grasos de cadena larga (Nielsen *et al.*, 2009a). Dichos sustratos son tomados bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas y almacenados como reservas de lípidos, utilizándolos para su crecimiento con oxígeno o nitrato como aceptores terminales de electrones. La elevada

hidrofobicidad de la pared celular de *Ca. 'Microthrix parvicella'*, junto con las actividades exoenzimáticas esterasa y lipasa asociadas a su superficie, la hacen competitiva en la asimilación y crecimiento a partir de lípidos y grasas (Nielsen *et al.*, 2002).

Son numerosos los estudios que han centrado sus objetivos en la descripción fenotípica, filogenética y fisiológica de bacterias *Microthrix*, siendo menores aquellos que lo han hecho estudiando espacial o temporalmente su ecología en plantas depuradoras a escala real, empleando sondas FISH específicas (Mielczareck *et al.*, 2012, Miłobędzka & Muszyński, 2015; Santos *et al.*, 2015; Miłobędzka *et al.*, 2016) o análisis metagenómico (Guo & Zhang, 2012; Wang *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2016).

Nuestros resultados sobre la comparación entre la técnica convencional vs. FISH en la identificación y abundancia de *Candidatus 'Microthrix parvicella'* y *'Microthrix calida'* sugieren que la abundancia del primero puede ser aproximada utilizando la técnica convencional, siendo recomendable su verificación a partir de la sonda específica de *'Microthrix calida'* (MPA-T1-1260) cuando la T^ar sea superior a 30 °C (Zornoza *et al.*, 2016a). Además, el uso exclusivo de la sonda MPA60 infravaloró la abundancia de la población de filamentos *Ca. 'Microthrix parvicella'*, siendo más adecuada la sonda MPA645 para su monitorización en fangos activos. Por ello, a continuación se discuten los resultados obtenidos con las sondas MPA645 y MPA-T1-1260 en la EDAR donde fueron utilizadas (CX), empleando en el resto de biorreactores la identificación convencional del morfotipo "*Microthrix parvicella'*". Por último, la respuesta positiva de la sonda MPAall-1410 y negativa de las sondas MPA645 y MPA60 observada en algunas muestras en CX podría dar indicios de una biodiversidad de bacterias *Microthrix* no descrita hasta el momento.

Las condiciones de limitación del OD ofrecen a "*M. parvicella'*" una ventaja metabólica competitiva en la colonización de los fangos activos, cuyos bajos valores (aproximadamente de 0,4 mg/L) producen filamentos largos y regulares con pérdida celular o tricomas deformados (Rossetti *et al.*, 2005). En este sentido, algunos autores han concluido que elevadas concentraciones del OD (>6 mg/L) pueden ser tóxicos para "*M. parvicella'*", siendo considerado por ello un microorganismo microaerófilo (Slijkhuis, 1983). Los resultados obtenidos a partir del modelo lineal de variables OPE de DN han revelado que la población de "*M. parvicella'*" fue elevada cuando los valores del ODb fueron elevados (>68-70%), estando de acuerdo con la ventaja competitiva descrita para dicho organismo en condiciones de limitación del OD. Además, nuestras observaciones a partir del modelo de QB indicaron que elevados valores del TRHds (limitación de oxígeno) se asociaron con el aumento de la población de "*M. parvicella'*", lo cual también sería consistente con dicha ventaja competitiva. Por otro lado, los valores bajos de velocidad máxima de crecimiento (μ_{\max}) de "*Microthrix parvicella'*" en el rango 0,3-0,66 d⁻¹ (Slijkhuis, 1983; Slijkhuis *et al.*, 1984; Tandoi *et al.*, 1998; Rossetti *et al.*, 2002), indican que dicho microorganismo requiere elevados valores de la EF para su

supervivencia en las EDAR (Rossetti *et al.*, 2005), lo cual confirma la ocurrencia de “*M. parvicella*” en plantas depuradoras diseñadas para la eliminación de nutrientes (Jenkins *et al.*, 2004; Eikelboom, 2006). Algunos autores han señalado que dichos microorganismos filamentosos se encuentran favorecidos por valores de la EF superiores a 10 días (Eikelboom, 2000, 2006), incluso algunos afirman que se requieren dichos valores para que “*M. parvicella*” cause episodios de *bulking* y *foaming* (Richard, 1989). Nuestros resultados sobre la influencia de la EF en la EDAR CX fueron contrarios, puesto que las mayores abundancias de *Ca. ‘M. parvicella’* (MPA645) se dieron cuando los valores de la EF fueron inferiores a 10 días. Además, los experimentos llevados a cabo en reactores a escala de laboratorio por Noutsopoulos *et al.* (2006) han mostrado una reducción significativa de “*M. parvicella*” cuando los valores de la EF fueron inferiores a 5,7 días entre 14 y 18 °C. En este sentido, nuestras observaciones en los biorreactores CXAB y CXCD también serían contrarias a las encontradas por dichos autores, puesto que fueron estimados valores del índice de filamentos (IF) de 4 y 5 en el rango de T^r de 15-18 °C. Por otro lado, los resultados obtenidos a partir del modelo lineal de variables OPE de la matriz total parecen indicar que la EF no influyó en términos generales en la dinámica poblacional de *Ca. ‘M. parvicella’*, encontrándose resultados similares en algunos trabajos pero sin llegar a ser concluyentes (Santos *et al.*, 2015; Milobędzka *et al.*, 2016). En base a lo expuesto anteriormente, el morfotipo “*M. parvicella*” parece encontrarse muy abundante (IF=5) en un intervalo amplio de EF, por lo que no debería ser considerada una variable determinante en la aparición de episodios de *bulking* y/o *foaming* causados por dicho morfotipo, aunque valores superiores a 10 días puedan contribuir a su crecimiento.

Los resultados obtenidos a partir del modelo lineal de las variables FQLM de QB podrían ser consistentes con la baja EF asociada en CXAB y CXCD, puesto que “*M. parvicella*” se relacionó con elevada CondLM, que a su vez ha sido atribuido a la elevada CM. Según las observaciones de Eikelboom (2000), valores de CM inferiores a 0,2 Kg DBO₅/Kg SSLM.d favorecen el crecimiento del morfotipo “*M. parvicella*”, mientras que nuestros resultados sugieren que dicho morfotipo puede mostrarse abundante en un amplio rango de CM, incluso con elevados valores. En este sentido, algunos trabajos de investigación estudiando 16 EDAR con eliminación de nutrientes durante dos años parecen corroborar nuestras observaciones sobre la CM, no encontrando una relación entre *Ca. ‘M. parvicella’* (MPAmix) y la CM en el rango de 0,01-0,77 Kg DBO₅/Kg SSLM.d (Santos *et al.*, 2015). Por todo ello, consideramos, igual que en la EF, que la CM parece no ser una variable desencadenante de episodios de *bulking* y/o *foaming* causados por dicho morfotipo, aunque valores inferiores a 0,2 puedan contribuir a su crecimiento. Por otro lado, el modelo lineal obtenido del biorreactor CX nos ha permitido relacionar *Ca. ‘M. parvicella’* con valores bajos del NTLM, lo cual sería consistente con la elevada EF asociada. Por último, señalar que la capacidad de crecimiento de “*M. parvicella*” a temperaturas hasta 7 °C, observadas en cultivos puros y plantas a escala real, le confiere una ventaja competitiva durante las estaciones más frías (Rossetti *et al.*, 2005). De hecho, la proliferación de “*M. parvicella*” en las EDAR muestra un patrón estacional característico, apareciendo principalmente durante el invierno (Kristensen *et al.*, 1994; Wanner, 1994b; Eikelboom, 2000; Kruit *et al.*, 2002; Jenkins *et al.*, 2004; Rossetti *et al.*, 2005; Wang *et al.*,

2015; Jiang *et al.*, 2016). Algunos autores señalan que valores de la T^a_r inferiores a 15 °C favorecen el crecimiento del morfotipo “*M. parvicella*” (Eikelboom, 2000; Jenkins *et al.*, 2004). En nuestro trabajo, los resultados obtenidos a partir del modelo lineal de la matriz total de variables FQLM han revelado que la abundancia de “*M. parvicella*” se asoció a valores de T^a_r inferiores a 21 °C, coincidiendo este valor con las observaciones de Levantesi *et al.* (2006).

Estudios de ecofisiología *in situ* han demostrado que *Ca. Microthrix parvicella* es capaz de asimilar ácidos grasos de cadena larga (LCFAs, *long-chain fatty acids*), como son: el ácido oleico, trioleico y palmítico (Andreasen & Nielsen, 2000; Nielsen *et al.*, 2009a). Dichos sustratos son tomados bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas y almacenados como reservas de lípidos, utilizándolos para su crecimiento en presencia de oxígeno o nitrato como aceptores terminales de electrones (Andreasen & Nielsen, 2000; Hesselsoe *et al.*, 2005). Algunos estudios muestran que los filamentos de “*M. parvicella*” son más hidrofóbicos que la mayoría del resto de bacterias del fango activo (Nielsen *et al.*, 2002). Una superficie hidrofóbica puede atraer lípidos, como por ejemplo LCFAs y otras sustancias no polares, lo que resulta ventajoso cuando se compite por este tipo de sustrato (Rossetti *et al.*, 2005). Además, esta bacteria posee actividad lipasa en su superficie celular (Nielsen *et al.*, 2002), lo que permite mejorar su habilidad para tomar productos de lisis y LCFAs de los lípidos asociados con la superficie celular. Por todo ello y teniendo en cuenta que la baja temperatura característica del invierno (<18 °C) disminuye la solubilidad de los lípidos, *Ca. Microthrix parvicella* sería más competitiva que otros organismos heterótrofos que utilizan lípidos, explicando su ventaja competitiva en las EDAR (Andreasen & Nielsen, 2000). Basándonos en lo expuesto anteriormente, la variable aceites y grasas (AG) del afluente al reactor debería ser indiscutiblemente una de las variables ambientales a incluir en los estudios de ecología en plantas a escala real, siendo sorprendente que hasta el momento sean muy escasos los artículos publicados relacionando dicha variable con la población de bacterias filamentosas. Nuestro trabajo probablemente sea una de las primeras citas explorando la influencia de la carga de aceites y grasas (CAG) en el afluente al reactor biológico. En base a los resultados obtenidos, el incremento de la CAG por encima de 15 g/Kg SSVLM.d se relacionó con el aumento del morfotipo “*M. parvicella*” en QB, lo cual estaría de acuerdo con la fisiología descrita respecto a su especialización en el consumo del ácido oleico. Además, la mayor abundancia de dicho morfotipo en la EDAR CX respecto a QB podría ser debida, además de otras variables ambientales, a la mayor CAG registrada en la primera instalación a lo largo del estudio. Por otro lado, la asociación observada en CX entre *Ca. Microthrix parvicella* y la elevada CPT y CCarb sería consistente con la baja EF asociada, teniendo en cuenta la relación inversa que mantienen entre ellas. De forma similar, la relación entre el morfotipo “*M. parvicella*” y la elevada CNT en QB, sería consistente con la elevada CondLM asociada. Por último, señalar que *Ca. Microthrix calida* crece a una temperatura superior que *Ca. Microthrix parvicella*, en un rango entre 15-36,5 °C, aunque cabría esperar un crecimiento mayor a partir de 30 °C según Levantesi *et al.* (2006). *Ca. Microthrix calida* ha mostrado una abundancia mucho menor que *Ca. Microthrix parvicella* en los biorreactores CXAB y CXCD, alcanzado un IF máximo de 4 durante periodos de 20-21 °C, aproximadamente. Teniendo en cuenta que estos valores coinciden con el máximo de T^a_r para *Ca.*

'*Microthrix parvicella*' y que *Ca.* '*Microthrix calida*' se ha asociado a valores de CAG por encima de 30 g/Kg SSVLM.d en los biorreactores CXAB y CXCD, consideramos que dicho microorganismo probablemente requiera mayor CAG para ser competitivo al disminuir la solubilidad de los lípidos en el reactor (al incrementar su temperatura). Algunos autores han sugerido que ambos microorganismos filamentosos podrían encontrarse influenciados por variables ambientales similares en las EDAR, a excepción de la T^{ra}r (Seviour *et al.*, 2008). De nuestras observaciones se deduce que la dinámica poblacional de *Ca.* '*M. calida*' se encuentra influenciada por variables ambientales distintas a las correspondientes a *Ca.* '*M. parvicella*', puesto que las variables ambientales de la EDAR CX asociadas a esta último microorganismo han sido diferentes a *Ca.* '*M. calida*'. Aunque nuestros resultados todavía no sean concluyentes, podrían considerarse una de las primeras citas explorando la influencia de las variables ambientales en la dinámica poblacional de *Ca.* '*M. calida*', en comparación a *Ca.* '*M. parvicella*'. Por todo ello, sería muy interesante continuar con su estudio.

Algunos autores han demostrado que "*M. parvicella*" requiere N-NH₄⁺ para su crecimiento (Slijkhuis, 1983), como fuente de nitrógeno disponible en condiciones aerobias debido a un bajo rendimiento del proceso de nitrificación (Tsai *et al.*, 2003). En este sentido, el efecto positivo de fuentes del nitrógeno, como el nitrato y amonio (resultado de una desnitrificación y nitrificación deficientes) en el crecimiento de "*M. parvicella*", ha sido también observado en plantas depuradoras a escala real (Kruit *et al.*, 2002). Nuestros resultados sobre la relación de "*M. parvicella*" con los componentes del nitrógeno del efluente estarían de acuerdo con dichos autores, puesto que el bajo rendimiento del proceso de nitrificación (aumento del N-NH₄⁺ y %N-NO₂⁻) se asoció con el aumento de la población de *Ca.* '*M. parvicella*' en CX.

A pesar de los elevados valores de abundancia de bacterias *Microthrix* observados en los biorreactores estudiados, estas no mostraron un crecimiento excesivo ni causaron episodios de *bulking*. Por esta razón no hemos podido determinar aquellas variables ambientales que desencadenan dichos episodios, a pesar de aportar algunos resultados interesantes escasamente documentados hasta el momento. Los estudios de fisiología a partir de cultivos puros y ecofisiología *in situ* han aportado una valiosa información sobre bacterias *Microthrix*, aunque insistimos en la necesidad de continuar estudiando su ecología en EDAR a escala real empleando técnicas moleculares para su identificación, como son la técnica FISH y el análisis metagenómico.

***Gordonia* sp.**

La mayoría de microorganismos filamentosos observados en episodios de espumación son, además de *Ca.* '*Microthrix parvicella*', miembros del grupo Mycolata; actinomicetos que contienen ácidos micólicos en sus paredes celulares (Soddell & Seviour, 1998). El grupo Mycolata se encuentra dentro del suborden *Corynebacterineae* dentro de la clase *Actinobacteria* y engloba especies bacterianas caracterizadas por presentar filamentos ramificados, actualmente

clasificados en 13 géneros: *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Millisia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Segniliparus*, *Skermania*, *Smaragdicoscus*, *Tomitella*, *Tsukamurella* y *Williamsia*. Por otro lado, se ha demostrado que dentro de dicho grupo se encuentran dos morfotipos, los cuales se pueden diferenciar fácilmente a partir de la microscopía convencional (Soddell *et al.*, 1992). El primero, el cual comparten varios géneros del grupo Mycolata, muestra filamentos ramificados aproximadamente en ángulo recto. Esta morfología fue inicialmente propuesta en la descripción de *Gordonia amarae* (Lechevalier & Lechevalier, 1974), denominando a los organismos con morfología similar como *Gordonia amarae*-like organisms (GALOs) (Soddell, 1999). El segundo, que muestra un patrón de distribución de ramificaciones en ángulo agudo, tal cual se ha descrito en *Skermania piniformis* (Chun *et al.*, 1997), ha sido originalmente denominado como “pine tree-like organisms” (PTLOs) (Blackall *et al.*, 1989). Con el fin de intentar entender el papel que juegan estos microorganismos en los episodios de *foaming*, han sido diseñadas distintas sondas FISH para su identificación *in situ* (de los Reyes *et al.*, 1997, 1998; Davenport *et al.*, 2000; Eales *et al.*, 2005). En nuestro estudio, la sonda Gor0596 ha hibridado con filamentos ramificados, permitiendo identificar los microorganismos filamentosos correspondientes al género *Gordonia* en los biorreactores QB, CT1 y CT2, los cuales presentaron graves problemas de *foaming* durante gran parte del periodo de muestreo. A su vez, ha sido empleada la identificación convencional del morfotipo GALO, con el fin de comparar los resultados obtenidos con la sonda Gor0596 e identificar la presencia de bacterias formadoras de espumas en los biorreactores CXAB, CXCD y DN. La sonda específica para la detección de bacterias con morfología tipo *Skermania piniformis* (Spin1449) no ha hibridado en las muestras procesadas.

Desde el primer episodio de *foaming* filamentoso documentado en 1969, el estudio de la dinámica poblacional del grupo Mycolata en fangos activos se ha caracterizado por las discrepancias entre los distintos investigadores. Por ejemplo, los resultados obtenidos sobre la ecofisiología *in situ* del grupo Mycolata, determinada a partir de MAR-FISH, han mostrado algunas discrepancias entre los trabajos de Eales *et al.* (2006), Carr *et al.* (2006) y Kragelund *et al.* (2007). Incluso se han observado diferencias cuando se han comparado los resultados de ecofisiología *in situ* con aquellos obtenidos a partir de cultivos puros, como por ejemplo; el crecimiento de *G. amarae* en cultivo puro de ciertos sustratos, como el ácido oleico, frente a la asimilación no detectada *in situ* por algunos investigadores (Carr *et al.*, 2006; Kragelund *et al.*, 2007b). Algunos autores han incluido las bacterias Gram positivas (Mycolata) dentro del grupo “formadores de espumas versátiles” (Nielsen *et al.* 2009a), debido al amplio espectro de sustratos capaces de ser asimilados por las bacterias pertenecientes a este grupo (Kragelund *et al.*, 2007b), lo cual parece explicar la codominancia observada con *Ca. ‘Microthrix parvicella’* en fangos activos (Seviour *et al.*, 2008). Probablemente, los mayores esfuerzos en la investigación relativo a las bacterias formadoras de espumas del grupo Mycolata hayan ido encaminados a resolver su filogenia, describir los mecanismos de formación de la espuma y el estudio de estrategias no específicas para combatir los episodios de espumación en plantas a escala real.

A pesar de los estudios descriptivos sobre el origen y alternativas para el control de los episodios de *foaming* recogidos en los manuales de Jenkins *et al.* (2004) y Tandoi *et al.* (2006), los estudios de ecología de bacterias del grupo Mycolata a escala temporal y espacial han sido más bien escasos (Frigon *et al.*, 2006; Asvapathanagul *et al.*, 2012; Mielzareck *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2016). Algunos autores señalan la falta de comprensión de los factores fisicoquímicos y biológicos que desencadenan los episodios de *foaming*, no encontrándose variables operacionales y fisicoquímicas del agua residual y criterios de diseño desencadenantes de dichos episodios (Asvapathanagul *et al.*, 2012). En este sentido, nuestro trabajo probablemente sea uno de los primeros, mediante técnicas estadísticas multivariantes de interpretación ambiental, que aporta información sobre aquellas variables ambientales en EDAR relacionadas con los episodios de *foaming*, en este caso a partir de los registrados en las EDAR de QB y CT.

De forma muy común se ha señalado que el grupo Mycolata lo forman organismos obligatoriamente aerobios (Chun *et al.*, 1997; Soddell & Seviour, 1998). Sin embargo, los resultados de los estudios de ecofisiología *in situ* parecen contradecir dicha afirmación, puesto que en algunos estudios la asimilación del sustrato ha sido también observado bajo condiciones anóxicas y anaerobias (Eales *et al.*, 2005, 2006; Carr *et al.*, 2006), utilizando nitrato y nitrito (menor asimilación) como aceptores terminales de electrones (Kragelund *et al.*, 2007b). Teniendo en cuenta lo indicado sobre el OD, parece lógico que algunos autores no hayan encontrado una relación significativa entre dicha variable y *Gordonia* sp. (Frigon *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2016), Mycolata (Myc657) (Santos *et al.*, 2015) y *Gordonia amarae* (Asvapathanagul *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos a partir del modelo lineal de variables OPE del biorreactor QB han revelado un incremento de la población de *Gordonia* sp. con el incremento del TRHds, lo cual sería consistente con las condiciones anóxicas y anaerobias asociadas anteriormente. Por otro lado, la relación directa encontrada entre la CO₃ y *Gordonia* sp. en la EDAR CT sería contraria a la que cabría esperar, puesto que el objetivo del ozono suministrado a los biorreactores CT1 y CT2 era la disminución y control de la población de *Gordonia* sp. Por ello, concluimos que dicha aplicación no ha sido efectiva para su control. Por último, la relación encontrada entre *Gordonia* sp. y el bajo ODb en el biorreactor DN ha sido considerada no significativa por la baja frecuencia y abundancia (IF) observada. En este sentido, tampoco hemos considerado significativas las relaciones obtenidas a partir de la matriz total de variables OPE debido a la baja frecuencia y abundancia observadas en la EDAR CX.

La variable CM ha sido considerada relevante en los episodios de *foaming* (Dhaliwal, 1979). Sin embargo, los resultados sobre la importancia de dicha variable han sido contradictorios en numerosos estudios, probablemente al no considerar la influencia del TRHr. En este sentido, los resultados del estudio de Madoni *et al.* (2000) durante 3 años en 167 EDAR indicaron que los episodios de *foaming* se originaron cuando la CM se encontraba en el intervalo de 0,1-0,2 Kg DBO₅/Kg SSLM.d. Por otro lado, la población de bacterias nocardioformes ha sido asociada a un intervalo de CM muy amplio según algunos manuales de identificación convencional (0,1-0,7 Kg DBO₅/Kg SSLM.d) (Eikeboom, 2000; Jenkins *et al.*, 2004), debido probablemente a la agrupación de bacterias GALO y tipo

Skermania. Algunos autores han observado que descensos seguidos de incrementos en la CM por debajo de 0,2 Kg DBO₅/Kg SSLM.d y concentración de la DBO₅ del afluente primario fueron los factores determinantes en el crecimiento inicial de *Gordonia amarae* (Asvapathanagul *et al.*, 2012). Por otro lado, Tsang *et al.* (2008) concluyeron que los microorganismos nocardioformes se encontraron favorecidos cuando la CM se mantuvo por debajo de 0,5 Kg DBO₅/Kg SSLM.d. Contrariamente, Frigon *et al.* (2006) y Maza-Márquez *et al.* (2015) han encontrado, a partir del análisis multivariante, que la CM no fue una variable significativa durante los episodios de *foaming*. Otros autores asociaron la población de bacterias Mycolata en 16 EDAR durante 2 años con el incremento de la CM, referido a un intervalo de 0,1-0,77 Kg DBO₅/Kg SSLM.d (Santos *et al.*, 2015). Nuestros resultados parecen ser más consistentes con los encontrados por estos últimos autores, puesto que la población de *Gordonia sp.* se asoció con un elevado coeficiente de correlación ($r=0,95$) a valores de CondLM por encima de 2000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, teniendo en cuenta que dicha variable se ha relacionado en QB con la CM. Dicha asociación podría ser consistente con la elevada versatilidad en la asimilación de sustratos por parte de las bacterias pertenecientes al grupo Mycolata, como son: SCFA (*short-chain fatty acids*), LCFA, monosacáridos y proteínas (Carr *et al.*, 2006; Kragelund *et al.*, 2007b; Nielsen *et al.*, 2009a). Un incremento de la carga afluente al reactor también puede en determinados casos asociarse a un incremento significativo de determinados sustratos y producir cambios en la composición del flóculo, lo cual podría ser un ventaja competitiva para *Gordonia sp.*, teniendo en cuenta que dicho género es capaz de acumular polihidroxialcanoatos (PHA) y polifosfatos en forma de compuestos de reserva energética (Carr *et al.*, 2006; Kragelund *et al.*, 2007b) y presentar una diversa actividad exoenzimática (Shade & Lemmer, 2006; Kragelund *et al.*, 2007b; Zornoza *et al.*, 2013).

El papel de la temperatura en la ocurrencia de los episodios de *foaming* se encuentra bien documentada. En este sentido, algunos autores indican una elevada frecuencia de dichos episodios en climas templados (Pipes, 1978; Pitt & Jenkins, 1990; Soddell & Seviour, 1994; Soddell, 1999). Se ha sugerido que dichas observaciones son debidas al elevado mínimo (10-15 °C) (Soddell & Seviour, 1995) y al óptimo (28 °C) (Lemmer & Popp, 1982) de temperatura de crecimiento de *Gordonia sp.* En nuestro caso, los resultados obtenidos a partir del modelo lineal de variables FQLM del biorreactor QB no indicaron una relación de dicho género con la T^ar, observándose en un intervalo de 17-25 °C. Contrariamente, en la EDAR CT se ha observado una relación inversa con la T^ar, incrementándose la población de *Gordonia sp.* por debajo de 20 °C. Frigon *et al.* (2006) sugieren que el aumento de la T^ar incrementa sustancialmente la hidrólisis de compuestos de origen lipídico, y por lo tanto, ante un incremento de la carga de dichos compuestos se desencadenan episodios de *foaming* causados por *Gordonia sp.* y bacterias del grupo Mycolata. Dicho mecanismo propuesto, documentado a partir de un estudio en una EDAR durante 8 años, no ha sido corroborado ni demostrado en posteriores trabajos sobre incidencia de episodios de *foaming*. En base a nuestros resultados, y teniendo en cuenta el amplio rango de temperatura para el crecimiento de *Gordonia sp.*, consideramos

que la T^{ar} probablemente no sea una variable determinante en la formación de espumas, estando de acuerdo con lo señalado por algunos autores (Asvapathanagul *et al.*, 2012; Parada-Albarracín *et al.*, 2012; Maza-Márquez *et al.*, 2015).

De forma común, elevadas concentraciones de aceites y grasas en el afluente han sido sugeridas como posibles causas en el desarrollo de microorganismos del grupo Mycolata (Eikelboom, 2000; Jenkins *et al.*, 2004). Además, algunos autores han asociado elevadas concentraciones de grasas con episodios de *foaming* (Lemmer, 1986; Khan & Forster, 1991; Forster, 1992), mientras que la habilidad de las bacterias formadoras de espumas de consumir sustratos hidrofóbicos ha sido demostrada en laboratorio (Iwahori *et al.*, 1995; Soddell & Seviour, 1996) y en estudios de modelización (Kappeler & Gujer, 1994). De forma específica, *Gordonia amarae* es capaz de crecer bien a partir de sustratos hidrofóbicos, como son: aceite de oliva, aceite de cártamo, aceite de coco, Tween 80 y trioleato como única fuente de carbono (Lemmer & Baumann, 1988; Soddell, 1997), debido probablemente a que su pared celular es altamente hidrofóbica (Blackall & Marshall, 1989). Por otro lado, Soddell (1997) también demostró que *Gordonia amarae* no crece con ácido oleico y palmítico como única fuente de carbono después de dos semanas. Además, estos resultados han podido ser corroborados a partir de estudios de ecofisiología *in situ*, indicando que el ácido oleico parece no ser asimilado en presencia de otros sustratos (Carr *et al.*, 2006; Kragelund *et al.*, 2007b), así como el ácido palmítico (Kragelund *et al.*, 2007b). Contrariamente, los resultados de Carr *et al.* (2006) indican que *Gordonia amarae* es capaz de asimilar ácido palmítico, sugiriendo que podría mostrar una elevada selectividad por dicho sustrato en las espumas del fango activo. Algunos autores han encontrado que elevadas concentraciones de lípidos en el afluente, debido a una derivación de la línea de tratamiento primario, han contribuido al desarrollo de *Gordonia amarae* y bacterias del grupo Mycolata, originando graves episodios de *foaming* (Frigon *et al.*, 2006). En nuestro estudio, los resultados obtenidos a partir del modelo lineal de la matriz de variables FQAF del biorreactor QB han demostrado que la elevada CAG y CNT, por encima de 15 y 50 g/Kg SSVLM.d, respectivamente, se asociaron con la mayor abundancia de *Gordonia* sp. y la formación de espumas. En el caso del biorreactor CT1, la relación inversa encontrada con la CS²⁻ no ha permitido alcanzar ninguna conclusión.

La relación entre *Gordonia* sp. y los componentes del nitrógeno en el tanque de aireación en EDAR a escala real ha sido escasamente explorada (Jiang *et al.*, 2016). Los resultados obtenidos a partir del modelo lineal de QB han revelado una relación moderada significativa entre *Gordonia* sp. y valores de concentración de N-NO₂⁻ superiores a 1 mg/L. Jiang *et al.* (2016) encontraron la misma relación, además de relacionar *Gordonia* sp. con baja concentración de N-NO₃⁻, lo que podría dar indicios de una posible capacidad de reducción del nitrato a amonio por parte de dicho género. Los resultados obtenidos a partir de la matriz total, a pesar de la baja abundancia de *Gordonia* sp. en CX y DN, parecen indicar una cierta relación de GALO con baja concentración de N-NO₃⁻ y elevada del N-NH₄⁺, lo cual podría ser consistente con las primeras observaciones de Jiang *et al.* (2016). No obstante, consideramos que

nuestros resultados son insuficientes y no concluyentes, y que sería interesante continuar estudiando la relación entre *Gordonia* sp. y los componentes del nitrógeno.

En resumen, nuestros resultados sobre la relación entre variables ambientales y *Gordonia* sp. han permitido corroborar las observaciones realizadas hasta el momento por otros autores, aportando por nuestra parte interesantes valores ambientales relacionados con la dinámica poblacional de dicho género. Desde nuestra experiencia, hemos observado el crecimiento excesivo de *Gordonia* sp. cuando la microestructura flocular ha mostrado abundantes zonas aerobias, es decir, zonas con abundante material exopolimérico celular respecto a un menor *debris*. Dicha estructura flocular es común cuando se incrementa la CM o se dan variaciones bruscas en la carga orgánica, lo cual incrementa a su vez la proporción de bacterias formadoras de flóculo, y por lo tanto, mayor biopolímero. La baja T^a_r puede contribuir, debido al estrés bacteriano, a un incremento del biopolímero en el flóculo. Además, las cortas ramificaciones características de *Gordonia* sp. la hacen muy competitiva en el interior del flóculo, desarrollándose rápidamente dentro del mismo, y pudiendo pasar desapercibidas en las primeras fases de crecimiento si no se practica un tinción de Gram. Nuestros resultados publicados sobre la presencia *in situ* de actividades exoenzimáticas de *Gordonia* sp. en los biorreactores QB, CT1 y CT2 han demostrado elevada actividad fosfatasa y glucuronidasa (Zornoza *et al.*, 2013), mientras que otros autores han demostrado además actividades esterasa y lipasa (Shade & Lemmer, 2006; Kragelund *et al.*, 2007b). Consideramos que dichas actividades exoenzimáticas permiten a *Gordonia* sp. ser altamente competitiva en el interior del flóculo, pudiendo acceder a compuestos orgánicos y nutrientes limitantes, como por ejemplo el fósforo, además, algunos autores han determinado la elevada viabilidad y supervivencia del grupo Mycolata en las espumas biológicas (Kragelund *et al.*, 2008b). En base a lo expuesto, sería interesante que futuros estudios consideren, además de las actividades exoenzimáticas, un análisis químico avanzado de la microestructura del flóculo, y de esta forma avanzar en el conocimiento de las variables ambientales que causan el crecimiento excesivo de *Gordonia* sp.

Microorganismos filamentosos con crecimiento epifítico: los morfotipos 0041, 1851 y 1701

Los morfotipos 1851, 1701 y 0041 se caracterizan por presentar crecimiento epifítico a lo largo del tricoma, originando ocasionalmente problemas de *bulking* en EDAR (Seviour *et al.*, 1994; Wanner *et al.*, 1998). A continuación se discuten las relaciones encontradas entre el morfotipo 0041 y las variables ambientales, debido a la baja frecuencia de aparición de los morfotipos 1701 y 1851 durante el estudio.

Los morfotipos 0041 y 0675 han sido diferenciados a partir de su diámetro celular, siendo más estrecho en el caso del morfotipo 0675 (Eikelboom & van Buijsen, 1983; Jenkins *et al.*, 2004). Debido a las dificultades en su diferenciación, algunos autores han optado por combinar ambos bajo la denominación tipo 0041/0675 (Eikelboom, 2000). Dicho morfotipo ha sido identificado en EDAR de todo el mundo, siendo la segunda de la seis bacterias más

frecuentes en fangos activos de EDAR (Jenkins *et al.*, 2004; Tandoi *et al.*, 2006). Algunos autores han señalado una elevada incidencia de dicho morfotipo en EDARI del sector papelero, textil, químico y agroalimentario, originando elevados valores del IVF (Eikelboom, 2000, 2006). La posición filogenética de los miembros del morfotipo 0041/0675 es diversa. En este sentido, algunos estudios han mostrado afiliación con miembros del filo *Chloroflexi* (Björnsson *et al.*, 2002; Kragelund *et al.*, 2007a), mientras que otros lo han hecho con *Curvibacter* (recientemente reclasificados como *Aquaspirillum*) dentro de la clase *Betaproteobacteria* (Thomsen *et al.*, 2006b) y con el filo *Candidatus* TM7 (Hugenholtz *et al.*, 2001). En base a dicha diversidad y a las recomendaciones de algunos autores sobre el alcance de la microscopía convencional para su identificación (Kragelund *et al.*, 2009), hemos optado por su estudio basándonos en sus características morfológicas y respuesta a las tinciones diferenciales (Eikelboom, 2000, 2006; Jenkins *et al.*, 2004).

Los factores determinantes del crecimiento del morfotipo 0041/0675 son muy poco conocidos. Los resultados del estudio realizado por Santos *et al.* (2015) en 16 EDAR indican una ausencia de relación del morfotipo 0041/0675 con las variables ambientales, justificándolo a partir de su habilidad de supervivencia y adaptación a un amplio rango ambiental, tal cual han sugerido algunos autores (Blackbeard *et al.*, 1988; Bux & Kasan, 1994; Lacko *et al.*, 1999). Contrariamente, nuestros resultados han revelado que efectivamente existen una serie de valores ambientales que parecen influir en la dinámica poblacional del morfotipo 0041/0675, a pesar de no ocasionar en ningún momento incidencias de *bulking*.

Algunos autores han señalado que el morfotipo 0041/0675 se encuentra influenciado por elevados valores de la EF, baja concentración de OD y baja CM (Lau *et al.*, 1984; Seviour *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1996; Kämpfer, 1997; Eikelboom *et al.*, 1998). Además, Eikelboom (2000) y Jenkins *et al.* (2004) indican que valores de CM inferiores a 0,2 Kg DBO₅/Kg SSLM.d y valores de EF por encima de 8 días favorecen su crecimiento. Nuestros resultados estarían de acuerdo con ambas referencias, puesto que el morfotipo 0041/0675 se asoció en la EDAR CX con valores de EF superiores a 10 días. Por otro lado, algunas citas indican que dicho morfotipo podría sobrevivir y en cierta manera encontrarse favorecido por condiciones anóxicas o anaerobias (Wanner, 1994a; Wanner *et al.*, 1998), lo cual sería consistente con el elevado ODb asociado en el primer reactor de DN.

Respecto a las variables FQLM, el morfotipo 0041/0675 se ha asociado a bajos valores del NTLM, lo cual sería consistente con la elevada EF asociada en la misma EDAR, mientras que en QB lo ha hecho con bajos valores de la CondLM, lo cual sería consistente con la baja CM asociada por Eikelboom (2000) y Jenkins *et al.* (2004). Por otro lado, algunos autores han encontrado dominante a este morfotipo en EDAR de Dinamarca durante periodos de invierno (Andreasen & Sigvardsen, 1996; Eikelboom *et al.*, 1998), mientras que nuestros resultados lo han relacionado contrariamente con valores de T³r superiores a 20 °C. Además, los resultados obtenidos a partir del

modelo lineal de la matriz total de variables FQLM no revelaron ninguna relación con la T^a_r , lo cual sugiere que dicha variable parece no influir en la dinámica poblacional del morfotipo 0041/0675.

La ecofisiología *in situ* del morfotipo 0041/0675 utilizando las sondas de la división TM7 fue investigada en 2 EDAR de Dinamarca (Thomsen *et al.*, 2002). El hallazgo más sorprendente del estudio fue la incapacidad de dicho organismo de asimilar acetato en condiciones aeróbicas, corroborando los experimentos previos de Andreasen & Nielsen (1997), puesto que dicho sustrato es considerado uno de los más importantes en la mayoría de aguas residuales (Wanner, 1994), siendo consumido por la mayoría de bacterias en EDAR de eliminación de nutrientes (Nielsen & Nielsen, 2002). Los experimentos de Thomsen *et al.* (2002) han demostrado que tanto las bacterias que hibridaron positivamente como las que no hibridaron con las sondas de la división TM7, consumieron glucosa y manosa en condiciones aerobias. Sin embargo, dichos autores observaron una variabilidad en el consumo de galactosa, glicina, leucina y ácido oleico, lo que parece demostrar cierta diversidad fisiológica. Además, las tasas de asimilación de glucosa y galactosa bajo condiciones anóxicas fueron comparables con aquellas observadas bajo condiciones aerobias, siendo la glucosa asimilada estrictamente en condiciones anaerobias. Nuestros resultados obtenidos a partir del modelo lineal de QB han revelado una relación moderada con baja CAG, lo cual podría ser consistente con la baja tasa de asimilación de ácidos grasos de cadena larga, como por ejemplo el ácido oleico, observada por Thomsen *et al.* (2002). Además, la baja CNT relacionada junto a la CAG también podría ser consistente con la baja CM asociada al morfotipo 0041. Contrariamente a lo esperado, se ha observado una relación significativa inversa con la CCarb en el biorreactor CX, a pesar de la capacidad del morfotipo 0041/0675 de asimilar glucosa en condiciones aerobias, anóxicas y anaerobias. Además, en el mismo reactor ha sido asociado con baja CPT, siendo consistente ambas observaciones con la influencia de la carga débil. Estos resultados podrían justificar la elevada capacidad exoenzimática esterasa, fosfatasa y glucuronidasa del morfotipo 0041/0675, encontrada por algunos autores en plantas a escala real (Shade *et al.*, 2006), permitiendo asimilar sustratos orgánicos del flóculo por otras vías más competitivas cuando la biodiversidad bacteriana es elevada. Por último, la relación moderada encontrada con elevada CS^{2-} no ha podido ser comparada con ningún estudio previo, señalando algunos autores que su capacidad fermentativa todavía es cuestionable (Nielsen *et al.*, 2009a).

Según indican Thomsen *et al.* (2002), el morfotipo más común con crecimiento epifítico que aparece con mayor frecuencia en plantas de eliminación de nutrientes es el morfotipo 0041/0675. En este sentido, nuestros resultados parecen estar de acuerdo con dichos autores, al revelar que su dinámica poblacional se asoció con el rendimiento del proceso de nitrificación, relacionándose con baja concentración de $N-NO_2^-$ en QB, y bajo $\%N-NO_2^-$ y $N-NH_4^+$ en CX y matriz total. Nuestras observaciones probablemente sean una de las primeras citas que han demostrado que el morfotipo 0041/0675 se correlaciona espacial y temporalmente con excelentes rendimientos del proceso de nitrificación. Probablemente dicha relación sea debida a la elevada EF y baja CM asociadas, así como a su posible

capacidad de utilizar N-NO_3^- como aceptor terminal de electrones en la asimilación de sustrato en condiciones anóxicas.

La diversidad filogenética del morfotipo 0041/0675 es una característica indiscutible que señalan algunos autores (Thomsen *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2009a), cuya sonda relativa a la subdivisión TM7 ha sido tan solo capaz de identificar aproximadamente el 15% de los filamentos 0041/0674 (Thomsen *et al.*, 2002). Además, no existen miembros de la división TM7 en cultivo puro (Hugenholtz *et al.*, 2001), siendo la única referencia la correspondiente a nueve aislados del morfotipo 0041, basados en su morfología y sin información exacta de su identidad y requerimientos nutricionales (Williams & Unz, 1985b). Por otro lado, es muy probable que la aparente incapacidad de asimilar acetato y su relación con cargas orgánicas débiles de afluentes de origen urbano justifiquen su elevada capacidad exoenzimática (Shade *et al.*, 2006). Además, su capacidad competitiva en la asimilación de monosacáridos y aminoácidos quizás se manifieste más en las EDARI, donde es común encontrar una baja biodiversidad de microorganismos filamentosos. La incidencia de problemas de *bulking* originados por el morfotipo 0041/0675 parece centrarse más en este tipo instalaciones, donde se han llegado a identificar hasta nueve morfotipos diferentes (Eikeboom, 2006). A pesar de su frecuente presencia en plantas operando con baja CM y elevada EF, nuestros resultados obtenidos a partir de modelos de interpretación ambiental probablemente puedan ser considerados una de las primeras referencias.

Haliscomenobacter hydrossis

Microorganismos filamentosos pertenecientes al filo *Bacteroidetes* han sido identificados de forma común en sistemas de fangos activos (Wagner *et al.*, 1994; Kämpfer, 1995; Eikelboom, 2000; Jenkins *et al.*, 2004), siendo *Haliscomenobacter hydrossis* el único morfotipo dentro de este filo que ha podido ser aislado y caracterizado (van Veen *et al.*, 1973; Eikelboom, 1975; Williams & Unz, 1985b; Kämpfer, 1995). A pesar de encontrarse en muestras de fangos activos con problemas de *bulking* y *foaming* en USA, algunos países europeos, sur de África y Australia (resumidos en Jenkins *et al.*, 2004), ha sido considerado un microorganismo que causa ocasionalmente problemas de separación del fango activo, a pesar de ser muy frecuente (Kragelund *et al.*, 2008a).

La sonda HHY para la detección de microorganismos similares a *H. hydrossis* fue diseñada a partir del aislado DSM1100 (Wagner *et al.*, 1994). Durante el proyecto DYNAFILM (*Dynamics and composition of filamentous microorganism communities in industrial water systems*), algunos autores encontraron una baja correlación entre los resultados obtenidos con la sonda HHY y aquellos obtenidos a partir de la microscopía convencional (Eikelboom, 2006). Nuestros resultados parecen estar también de acuerdo con dichas observaciones, puesto que los valores del IF a partir de la sonda HHY fueron muy superiores a los encontrados a partir del método convencional. Dicha desviación ha sido probablemente debida a la gran dificultad en la cuantificación convencional de filamentosos *H. hydrossis* en posición

intraflocular, teniendo en cuenta las reacciones Gram y Neisser negativas y los filamentos de pequeña longitud característicos (10-100 μm) (Jenkins *et al.*, 2004). Por esta razón, hemos considerado no significativos los resultados de asociación entre las variables ambientales y el IF del morfotipo *H. hydrossis*, centrando nuestra discusión en aquellos obtenidos a partir de la sonda HHY.

La bacterias con forma de “aguja”, cortas y estrechas han sido de forma común afiliadas con miembros de *H. hydrossis*, del género *Haliscomenobacter* (familia *Saprospiraceae*) dentro del filo *Bacteroidetes*. Sin embargo, otros filamentos con la misma morfología han sido con frecuencia observados, perteneciendo a otros miembros de *Bacteroidetes* (Kragelund *et al.*, 2008a) o incluso perteneciendo al filo *Chloroflexi* (Kragelund *et al.*, 2007a). Otras bacterias filamentosas parecen también mostrar una apariencia similar, siendo su posición filogenética todavía desconocida (Kragelund *et al.*, 2009). De forma adicional a la sonda HHY, Kragelund *et al.* (2008a) diseñaron dos nuevas sondas para la detección de filamentos con forma de “aguja” similares a *H. hydrossis*: HHY-654 y HHY-T5. Según estos autores, las tres sondas se ajustan a las descripciones morfológicas de filamentos *H. hydrossis* de Eikelboom (2000) y Jenkins *et al.* (2004), difiriendo en ocasiones dichos rasgos de las clásicas descripciones. Por ello, algunos autores recomiendan el empleo de sondas que hibriden con más miembros de la clase *Bacteroidetes*, como son: la sonda CFB719 (hibrida con la mayoría de miembros de la clase *Bacteroidetes*) y la sonda SAP-309 (hibrida con la mayoría de miembros de *Saprospiraceae*).

Los resultados del presente estudio han contribuido a demostrar que la cuantificación del morfotipo filamentoso *H. hydrossis* mediante la escala ordinal (IF) de Eikelboom (2000) y la técnica FISH con análisis de imagen no coinciden (Ferrer-Roglan, 2014). Al presentar filamentos principalmente cortos, los valores del IF son con mucha frecuencia elevados (IF=5), siendo por tanto baja su variabilidad cuando se explora la relación de *H. hydrossis* con las variables ambientales en las EDAR. Por este motivo, nuestros resultados han sido muy escasos, de la misma forma que algunos autores no han sido capaces de explicar la variabilidad de *H. hydrossis* empleando la escala ordinal propuesta por Jenkins *et al.* (2004) (Santos *et al.*, 2015), incluso utilizando tratamiento de imagen para su cuantificación (Mielzareck *et al.*, 2012; Miłobędzka *et al.*, 2016). Contrariamente, la metodología propuesta por Ferrer-Roglan (2014) para la cuantificación *H. hydrossis*, a partir de tratamiento de imagen, ha permitido relacionar dicho microorganismo con las variables ambientales de las EDAR.

Algunos autores han relacionado el morfotipo *H. hydrossis* con valores de CM superiores a 0,2 Kg DBO₅/Kg SSLM.d (Eikelboom, 2000), mientras que otros han asociado *H. hydrossis* (sonda HHY) con sobrecargas orgánicas durante periodos de bajo OD (Pernelle *et al.*, 2001). Estos resultados estarían de acuerdo con la mayor abundancia encontrada de *H. hydrossis* (sonda HHY) en CX cuando la CM fue superior a 0,16 Kg DBO₅/Kg SSVLM.d. Además, la asociación encontrada en QB entre dicho microorganismo filamentoso y el aumento de la CondLM sería consistente

con la elevada CM relacionada en CX. Por otro lado, también ha sido atribuida su mayor abundancia en QB con el incremento de la T^{ar}, cuya relación no ha podido ser contrastada con otros trabajos de investigación.

Son escasos aquellos trabajos realizados en fangos activos que han centrado sus objetivos en el estudio de la ecofisiología *in situ* de microorganismos filamentosos pertenecientes al filo *Bacteroidetes* (Kragelund *et al.*, 2008a). Los microorganismos filamentosos asociados morfológicamente a *Haliscomenobacter hydrossis* parecen encontrarse muy especializados en la degradación de polisacáridos, debido a su habilidad en la asimilación de glucosa y N-acetilglucosamina, un monómero que suele encontrarse polimerizado formando polisacáridos, principalmente de carácter estructural, como por ejemplo; lipopolisacáridos y peptidoglicano (Kragelund *et al.*, 2008a; Nielsen *et al.*, 2009a). Por otro lado, algunos autores han demostrado que los filamentos *H. hydrossis* son capaces de excretar numerosas exoenzimas, como son: quitinasa, glucuronidasa, esterasa y fosfatasa (Kragelund *et al.*, 2008a). Dichas exoenzimas parecen contribuir a la descomposición del peptidoglicano y lipopolisacáridos, procedentes principalmente de restos celulares (*decay*), en unidades más simples (N-acetilglucosamina), permitiendo a *H. hydrossis* disponer de una fuente continua de sustrato y proporcionando un nicho muy especializado en las EDAR. Nuestros resultados sobre la influencia de las variables FQLM, FQAF y componentes del nitrógeno han sido muy escasas, relacionándose tan solo de una forma moderada el incremento de la CAG en QB con la mayor abundancia de *H. hydrossis*, lo cual no sería muy consistente con el carácter hidrofílico de sus paredes celulares y la baja actividad lipasa determinada por Kragelund *et al.* (2008).

Tal cual hemos señalado anteriormente, los bajos coeficientes de correlación obtenidos a partir de los modelos lineales de los diferentes reactores han sido con mucha probabilidad debidos a que el método de cuantificación ordinal empleado no es el adecuado para representar la variabilidad de los filamentos *H. hydrossis*. Por ello, sería interesante que futuros estudios centraran su atención en mejorar la metodología para la cuantificación de microorganismos filamentosos en fangos activos, empleando incluso el análisis metagenómico para determinar aquellas variables ambientales en las instalaciones que más contribuyen a explicar su variabilidad. Por último, y debido a la localización preferentemente intraflocular de *H. hydrossis*, consideramos también de interés que futuros estudios exploren variables químicas relacionadas con la estructura flocular.

Morfotipo 0581

El morfotipo 0581 ha sido relacionado con fenómenos de *foaming* y *bulking* (Blackall, 1999; Soddell, 1999; Zornoza *et al.*, 2006) en las EDAR con sistema de fangos activos. De hecho, según Lemmer *et al.* (2005), el morfotipo 0581 es la bacteria filamentososa dominante en el 10% de las EDAR con problemas de espumas en Alemania. Además, dicho morfotipo presenta una gran similitud morfológica con *Microthrix parvicella*, diferenciándose de esta última por su distinta respuesta a la tinción de Gram, siendo positiva en el caso de *Microthrix parvicella* y negativa en el caso del

morfotipo 0581. Respecto a la tinción Neisser, a pesar de que algunos autores indican una reacción negativa completa (Eikelboom, 2000; Jenkins *et al.*, 2004), otros indican un reacción débil gránulos Neisser positiva (Zornoza *et al.*, 2006).

Hasta el momento no existe un estudio filogenético detallado de bacterias con morfología similar al morfotipo 0581. Zornoza *et al.* (2006) encontraron que el morfotipo 0581 hibridó positivamente con las sondas específicas del filo *Chloroflexi* (CFX1223+GNSB941), mientras que Santos *et al.* (2011) encontraron una respuesta positiva con las específicas del filo *Firmicutes* (LGC354A+LGC354B+LGC354C). En nuestro caso, los microorganismos 0581 presentes en QB, CXAB y CXCD han hibridado positivamente con la sonda CFX1223+GNSB941, estando de acuerdo con las observaciones de Zornoza *et al.* (2006).

Hasta el momento no se dispone de información sobre su metabolismo ni de aquellas condiciones que favorecen su crecimiento. Los únicos datos disponibles hasta el momento sobre la ocurrencia del morfotipo 0581 se encuentran referenciados en los manuales de Eikelboom (2000) y Jenkins *et al.* (2004), indicando su mayor abundancia en situaciones de baja CM. En este sentido, nuestros resultados sobre el aumento de filamentos 0581 al incrementar la EF por encima de 10 días en CX y conjunto de todos los biorreactores (matriz total OPE) serían consistentes con la baja CM asociada por dichos autores. Además, los resultados obtenidos a partir de la matriz total de variables FQLM indican una mayor abundancia con el descenso del NTLM, siendo consistente con la elevada EF asociada. Por último, la relación inversa encontrada entre la abundancia del tipo 0581 y la CPT y CCarb estaría también de acuerdo con la baja CM asociada.

Los resultados obtenidos que relacionan el morfotipo 0581 y los componentes del nitrógeno en CX indican que la mayor abundancia de dicho morfotipo fue observada con el descenso del $N-NH_4^+$ y $\%N-NO_2^-$, relacionándose por tanto con buenos rendimientos del proceso de nitrificación, tal cual cabría esperar por la baja CM y elevada EF asociadas.

Poco se conoce sobre la dinámica poblacional del morfotipo 0581 en fangos activos. Probablemente su incidencia en episodios de *foaming* y *bulking* sea mucho mayor de la que actualmente se piensa, debido quizás a que en la explotación rutinaria de las EDAR ha sido probablemente confundida con bacterias "*Microthrix parvicella*". Desde nuestra experiencia, observamos de forma muy común episodios severos de *foaming* y *bulking* causados por el morfotipo 0581 durante los períodos más calurosos en instalaciones que operan con elevados valores de la EF y baja de CM. En estas condiciones, hemos detectado una escasa presencia de filamentos "*Microthrix parvicella*" y una excesiva abundancia del tipo 0581. Cuando baja las temperaturas en invierno las abundancias suelen invertirse, siendo en estos casos dominante "*Microthrix parvicella*". Por todo ello, consideramos que ambos organismos podrían compartir determinadas características ecofisiológicas, siendo interesante su estudio a gran escala. Por último,

consideramos también probable que el morfotipo 0581 sea filogenéticamente diverso, tal cual ha sido demostrado en el caso de *Nostocoida limicola*.

Morfotipos 0411 y 1852

Los morfotipos 0411, 1852 (CX-02) y otro microorganismo denominado durante el estudio como CX-03 han mostrado una dinámica poblacional similar, asociándose con las mismas variables ambientales. Por ello, han sido discutidos conjuntamente.

Muy poco se conoce sobre la filogenia de bacterias filamentosas con morfología similar al morfotipo 0411, obteniéndose tan solo una secuencia 16S rRNA de un aislado procedente de Australia miembro del filo *Bacteroidetes* (Bradford *et al.*, 1996), lo cual no ha sido corroborado hasta el momento. Por otro lado, los factores que determinan el crecimiento del morfotipo 0411 son todavía desconocidos, siendo observado tan solo en fangos que operan con CM superior a 0,3 Kg DBO₅/Kg SSLM.d (Eikelboom, 2000) y 0,2 Kg DBO₅/Kg SSLM.d (Jenkins *et al.*, 2004). Respecto al morfotipo 1852, no se conoce su filogenia ni las condiciones ambientales que determinan su crecimiento, siendo además omitido en las claves de identificación convencional de los manuales de Eikelboom (2000) y Jenkins *et al.* (2004).

En nuestro trabajo, los valores de EF inferiores a 10 días en la EDAR CX parecen mostrarse como determinantes en el aumento de la abundancia de los morfotipos 0411 y 1852. En el caso del morfotipo 0411, nuestras observaciones serían consistentes con la elevada CM y bajos valores de EF asociados por algunos autores (Eikelboom, 2000; Jenkins *et al.*, 2004). Por otro lado, han sido relacionados con valores elevados del NTLM, así como valores también elevados de la CPT y CCarb en el afluente al reactor, lo cual sería consistente con la elevada CM y baja EF asociadas. Estas últimas condiciones ambientales probablemente han contribuido a la relación entre los morfotipos 0411 y 1852 y los bajos rendimientos del proceso de nitrificación de la EDAR CX. Los resultados de asociación encontrados en nuestro trabajo para el morfotipo 1852 podrían ser considerados los primeros hasta el momento.

CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

1. Existe un patrón definido en la distribución de protistas y metazoos en función del factor biorreactor (factor espacial) y a lo largo de las estaciones (factor temporal). Respecto a la comunidad de bacterias filamentosas, esta mostró únicamente una influencia marcada por el factor biorreactor, determinado por la configuración, diseño y características fisicoquímicas de las EDAR.
2. Los análisis exploratorios han revelado un patrón definido en la distribución de los componentes del nitrógeno en función del factor biorreactor, mientras que el factor estacional no tiene un efecto sobre los mismos.
3. Los modelos lineales revelan que la variable rNKTs es más adecuada que el rN-NH₄⁺ para definir bioindicadores (protistas y metazoos) del proceso. En este trabajo se propone por primera vez la conveniencia del empleo de la variable rNKTs en lugar del rN-NH₄⁺ para la búsqueda de organismos bioindicadores del rendimiento de la eliminación del nitrógeno. Además, se ha determinado que la inestabilidad del proceso de nitrificación se encuentra mejor representada por el %N-NO₂⁻ que por el N-NO₂, siendo por tanto una variable recomendada para el control en EDAR con eliminación de nutrientes.
4. En base a los resultados obtenidos, se proponen los siguientes organismos como bioindicadores de un buen rendimiento del proceso de nitrificación en fangos activos: grandes flagelados, *Entosiphon sulcatum*, *Peranema trichophorum*, *Pixydicula operculata*, *Arcella vulgaris*, *Trochilia minuta*, *Pseudochilodonopsis fluviatilis*, *Acineta tuberosa*, *Periacineta* sp., *Epistylis plicatilis*, *Opercularia articulata*, *Rotaria* sp. y *Lecane* sp. Los microorganismos propuestos como bioindicadores de bajos rendimientos del proceso de nitrificación son los siguientes: *Euplotes affinis*, *Opercularia coarctata*, *Vorticella aquadulcis*, *Vorticella convallaria* y *Vorticella microstoma*.
5. La metodología propuesta en el presente trabajo, empleando la rutina multivariante BIO-ENV, ha permitido aproximar la inercia biológica (protistas, metazoos y bacterias filamentosas) de las variables EF, CM, CMDQOs, TRHr, TRHds y OD, siendo diferente en los biorreactores estudiados. Además, esta metodología ha permitido aproximar la mejor posición de medida del OD para la monitorización del proceso. Por todo ello, consideramos el empleo de la rutina BIO-ENV como un paso imprescindible previo a la construcción de modelos de interpretación ambiental.
6. Los resultados comparativos, empleando la rutina BVSTEP y el test secuencial del DISTLM, han demostrado que el hecho de no tener en cuenta la tipología de las variables ambientales (físicoquímicas del licor mezcla y afluente y operacionales), puede llegar a excluir ciertas variables ambientales relevantes en los

modelos de ordenación, infravalorando su importancia en la explicación de la variabilidad biológica. Además, se recomienda que la interpretación ecológica de las variables biológicas en cada uno de los biorreactores sea prioritaria a su interpretación conjunta en la construcción de los mejores modelos de interpretación ambiental, con elevada capacidad de predicción.

7. Los resultados de los análisis exploratorios, a partir de las variables ambientales y en función de la estacionalidad, han revelado que existen diferencias significativas entre los biorreactores, por lo que se han construido distintos modelos de interpretación ambiental para entender la dinámica poblacional de protistas, metazoos y bacterias filamentosas. Los resultados de la ordenación han permitido correlacionar dichas variables ambientales con ambos factores, determinando las relaciones existentes entre ellas.
8. La construcción de modelos de regresión lineal múltiple multivariante basados en la distancia (DISTLM-dbrDA), así como la aproximación del óptimo ambiental de cada una de las especies/grupos de protistas y metazoos a partir del análisis de correspondencias canónico (CCA), han aportado información relevante sobre las relaciones entre estos grupos de organismos y las variables de control de planta, permitiendo su interpretación ecológica y obtención de bioindicadores para la monitorización del proceso biológico en fangos activos.
9. Los valores de EF y T^a_r , aproximadamente de 10 días y 20 °C, se encontraron como determinantes en la dinámica poblacional de protistas y metazoos. Por otro lado, la CPT ha resultado ser el factor con mayor influencia en la variabilidad de protistas y metazoos, observándose en todos los modelos construidos que el valor de 15 g PT/Kg SSVLM.d también es determinante en la dinámica poblacional. En base a nuestros resultados, proponemos la CPT como variable operacional alternativa a la CM. Además, la CM expresada como DQO soluble es más significativa que la expresada como DBO₅.
10. Nuestros resultados sobre la identificación y cuantificación convencional vs. FISH de la mayoría de bacterias filamentosas, excepto *Microthrix parvicella* y GALO, nos han permitido constatar que los resultados de la microscopía convencional no son comparables con aquellos obtenidos a partir de la técnica FISH. Además, los resultados de las características ecológicas encontrados empleando ambas técnicas son en muchos de los casos diferentes. Por todo ello, el uso exclusivo de la microscopía convencional puede conducir inevitablemente a errores a la hora de la toma de decisiones ante episodios de *bulking* y/o *foaming* filamentoso.
11. La construcción e interpretación de modelos de regresión lineal múltiple multivariante basados en la distancia (DISTLM-dbrDA) a partir de la información aportada, principalmente por cada uno de los

biorreactores, nos ha permitido asociar las distintas bacterias filamentosas a diferentes rangos ambientales, obteniendo una información valiosa para el conocimiento de su dinámica poblacional, que hasta el momento no se encuentra bien documentada. Además, se han obtenido resultados interesantes acerca de la relación entre determinadas bacterias filamentosas y algunos compuestos, como son los nitratos y nitritos, así como con los rendimientos del nitrógeno.

BIBLIOGRAFÍA

7 BIBLIOGRAFÍA

A

- Abraham, J.V., Butler, R.D., y Sigee, D.C. (1997) Ciliate populations and metals in an activated-sludge plant. *Water Research* **31**: 1103-1111.
- Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Farmer, M.A., Andersen, R.A., Anderson, O.R., Barta, J.R., Browser, S.S., Brugerolle, G., Fensome, R.A., Fredericq, S., James, T.Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C.E., Lewis, L.A., Lodge, J., Lynn, D.H., Mann, D.G., McCourt, R.M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S.E., Nerad, T.A., Shearer, C.A., Smirnov, A.V., Spiegel, F.W., y Taylor, M.F.J.R. (2005) The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **52**: 399-451.
- Agersborg, H.P.K., y Hatfield, W.D. (1929) The biology of a sewage treatment plant - a preliminary survey. *Sewage Works Journal* **1**: 411-424.
- Alawi, M., Lipski, A., Sanders, T., Eva Maria, P., y Spieck, E. (2007) Cultivation of a novel cold-adapted nitrite oxidizing betaproteobacterium from the Siberian Arctic. *ISME Journal* **1**: 256-264.
- Alonso, J.L., Cuesta, G., y Ramirez, G.W. (2009) *Manual de Técnicas Avanzadas para la Identificación y Control de Bacterias Filamentosas*. Valencia: EPSAR-Generalitar Valenciana.
- Al-shahwani, S.M., y Horan, N.J. (1991) The use of protozoa to indicate changes in the performance of activated sludge plants. *Water Research* **25**: 633-638.
- Amann, R.I., Krumholz, L., y Stahl, D.A. (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology* **172**: 762-770.
- Amman, R. (1994) Identification of uncultured bacteria: a challenge task for molecular taxonomist. *ASM News* **60**: 360-365.
- Amann, R.I., Ludwig, W., y Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and *in-situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* **59**: 143-169.
- Amann, R., Lemmer, H., y Wagner, M. (1998) Monitoring the community structure of wastewater treatment plants: a comparison of old and new techniques. *FEMS Microbiology Ecology* **25**: 205-215.
- Anderson, M.J. (2001a) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* **26**: 32-46.
- Anderson, M.J. (2001b) Permutation tests for univariate or multivariate analysis of variance and regression. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **58**: 626-639.
- Anderson, M.J., y ter Braak C.J.F. (2003) Permutation tests for multi-factorial analysis of variance. *Journal of Statistical Computation and Simulation* **73**: 85-113.

- Anderson, M.J., y Willis, T.J. (2003) Canonical analysis of principal coordinates: a useful method of constrained ordination for ecology. *Ecology* **84**: 511-525.
- Anderson, M.J., y Robinson, J. (2003) Generalized discriminant analysis based on distances. *Australian and New Zealand Journal of Statistics* **45**: 301-318.
- Anderson, M.J., Gorley R.N., y Clarke, K.R. (2008) *PRIMER + for PERMANOVA: Guide to Software and Statistical Methods*. PRIMER-E. Ltd, Plymouth. United Kingdom.
- Andreasen, K., y Nielsen, P.H. (1997) Application of microautoradiography to the study of substrate uptake by filamentous microorganisms in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3662-3668.
- Andreasen, K., y Nielsen, P.H. (2000) Growth of *Microthrix parvicella* in nutrient removal activated sludge plants: studies of *in situ* physiology. *Water Research* **34**: 1559-1569.
- Andreasen, K., y Sidvargsen, L. (1996) Experiences with sludge settleability in different process alternatives for nutrient removal. *Water Science and Technology* **33**(12): 137-146.
- Andújar, A.B., Zornoza, A., Lledías, M., y Alonso, J.L. (2013) Microscopía convencional versus FISH en la identificación y abundancia de los morfotipos filamentosos 0803, 0914 y 0092 en fangos activos. *Tecnoaqua* **4**: 60-79.
- Anonymous (1969) Milwaukee mystery: unusual operating problem develops. *Water Sewage Works* **116**: 213.
- Antonietti, R., Madoni, P., y Ghetti, P.F. (1981) Some notes on the biological self-purification process: Biological water treatment plants as man-made ecosystems. *Società Italiana di Ecologia, Atti* **1**: 379-382.
- APHA, 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed. American Public Health Association, Baltimore.
- Ardern, E., y Lockett, W.T. (1914) Experiments on the oxidation of sewage without de aid of filters. *Journal of the Society of Chemical Industry, London* **33**: 523-525.
- Ardern E. y Lockett W. T. (1923) The activated sludge process. Withington Works. *Chemistry and Industry*, 225T-230T.
- Ardern, E., y Lockett, W.T. (1928) *Manchester Rivers Department Annual Report*. Appendix, 41.
- Ardern, E., y Lockett, W.T. (1936) Laboratory tests for ascertaining the condition of activated sludge. *Water Pollution Control* **35**: 212-215.
- Arévalo, J., Moreno, B., Pérez, J., y Gómez, M.A. (2009) Applicability of the sludge biotic index (SBI) for MBR activated sludge control. *Journal of Hazardous Materials* **167**: 784-789.
- Aruga, S., Kamagata, Y., Kohno, T., Hanada, S., Nakamura, K., y Kanagawa, T. (2002) Characterization of filamentous Eikelboom type 021N bacteria and description of *Thiothrix disciformis* sp. nov. and *Thiothrix flexilis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 1309-1316.

- Arregui, L., Muñoz-Fontela, C., Serrano, S., Barasoain, I., y Guinea, A. (2002) Direct visualization of the microtubular cytoskeleton of ciliated protozoa with a fluorescent taxoid. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **49**: 312-318.
- Arregui, L., Muñoz, C., Guinea, A., y Serrano, S. (2003) FLUTAX employment simplifies the visualization of the ciliature of oxytrichid hypotrichs. *European Journal of Protistology* **39**: 169-172.
- Arregui, L., Serrano, S., Linares, M., Pérez-Uz, B., y Guinea, A. (2007) Ciliate contributions to bioaggregation: laboratory assays with axenic cultures of *Tetrahymena thermophila*. *International Microbiology* **10**: 91-96.
- Arregui, L., Linares, M., Pérez-Uz, B., Guinea, A., y Serrano, S. (2008). Involvement of crawling and attached ciliates in the aggregation of particles in wastewater treatment plants. *Air, Soil and Water Research* **1**: 13-19.
- Arregui, L., Liébana, R., Rodríguez, E., Murciano, A., Conejero, F., Pérez-Uz, B., y Serrano, S. (2012) Analysis of the usefulness of biological parameters for the control of activated sludge wastewater treatment plants in an interlaboratory study context. *Journal of Environmental Monitoring* **14**(5): 1444-1452.
- Aruga, S., Kamagata, Y., Kohno, T., Hanada, S., Nakamura, K., y Kanagawa, T. (2002) Characterization of filamentous Eikelboom type 021N bacteria and description of *Thiothrix disciformis* sp. nov. and *Thiothrix flexilis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 1309-1316.
- Asvapathanagul P., Huang, Z., Gedalanga, P.B., Baylor, A., y Olson, B.H. (2012) Interaction of operational and physicochemical factors leading to *Gordonia amarae*-like foaming in an incompletely nitrifying activated sludge plant. *Applied and Environmental Microbiology* **78**(23): 8165-8175.
- ATV, D.S.A. (2000) Dimensioning of single-stage activated sludge plants.
- Augustin, H., y Foissner, W. (1992) Morphologie und Ökologie einiger Ciliaten (Protozoa: Ciliophora) aus dem Belebtschlamm. *Archiv für Protistenkunde* **141**: 243-283.

B

- Baines, S., Hawkes, H. A., Hewitt, C. H., y Jenkins, S. H. (1953). Protozoa as indicators in activated-sludge treatment. *Sewage and industrial Wastes* **25**, 1023.
- Banina, N.N., Beyer, T.V., y Sukhanova, K.M. (eds) (1983) *Protozoa of Activated Sludge*. Academy of Sciences or USSR, Society of Protozoologist of USSR.
- Basu, B.K., y Pick, R. (1997) Factors related to heterotrophic bacterial and flagellate abundance in temperate rivers. *Aquatic Microbial Ecology* **12**: 123-129.
- Becharés, E. (1991) Microfauna of an activated sludge pilot plant treating effluents from a pharmaceutical industry en *Biological Approach to Sewage. Current Status and Perspectives*. Madoni, P. (ed). Perugia, pp. 105-108.
- Becharés, E. (1994) *Biología de una planta depuradora de fangos activados de doble etapa tratando aguas residuales de la industria farmacéutica*. Tesis. León: Universidad de León.

- Beer, M., Seviour, E.M., Kong, Y., Cunningham, M., Blackall, L.L., y Seviour, R.J. (2002) Phylogeny of the filamentous bacterium Eikelboom Type 1851, and design and application of a 16S rRNA targeted oligonucleotide probe for its fluorescence in situ identification in activated sludge. *FEMS Microbiology Letters* **207**: 179-183.
- Beman, J.M., Popp, B.N., y Francis, C.A. (2008) Molecular and biogeochemical evidence for ammonia oxidation by marine Crenarchaeota in the Gulf of California. *ISME Journal* **2**(4): 429-441.
- Bendinger, B., Rijnaarts H.H., Altendorf, K., y Zehnder, A.J. (1993) Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 3973-3988.
- Bick, H. (1968) Autokologische und saprobiologische. Untersuchungen an Süßwasserciliaten. *Hydrobiologia* **31**: 17-36.
- Bick, H. (1972) *Ciliated protozoa*. World Health Organization, Geneva, 198 pp.
- Bitton, G. (ed.) (2002a) *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Bitton, G., y Marshall, K.C. (eds) (1980) *Adoption of Microorganisms to Surfaces*. Ed. Wiley Interscience.
- Björnsson, L., Hugenholtz, P., Tyson, G.W., y Blackall, L.L. (2002) Filamentous Chloroflexi (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. *Microbiology* **148**: 2309-2318.
- Blackall, L., Hayward, A., Petti, A., y Greenfield, P. (1985) Biological foam and scum formation in activated sludge treatment plants en *11th Federal Convention, Australian Water and Wastewater Association*, pp. 338-345.
- Blackall, L.L., y Marshall, K.C. (1989) The mechanism of stabilization of actinomycete foams and the prevention of foaming under laboratory conditions. *Journal of Industrial Microbiology* **4**: 181-188.
- Blackall, L.L., Parlett, J.H., Hayward, A.C., Minnikin, D.E., Greenfield, P.F., y Harbers, A.E. (1989) *Nocardia pinensis* sp. nov., an actinomycete found in activated sludge foams in Australia. *Journal of General Microbiology* **135**: 1547-1558.
- Blackall, L., Harbers, A., Greenfield, P., y Hayward, A. (1991) Foaming in activated sludge plants: a survey in Queensland, Australia and an evaluation of some control strategies. *Water Research* **25**: 313-317.
- Blackall, L.L., Seviour, E.M., Cunningham, M.A., Seviour, R.J., y Hugenholtz, P. (1994) 'Microthrix parvicella' is a novel, deep branching member of the actinomycetes subphylum. *Systematic and Applied Microbiology* **17**: 513-518.
- Blackall, L.L., Stratton, H., Bradford, D., Del Dot, T., Sjørup, C., Seviour, E.M., y Seviour, R.J. (1996) "Candidatus Microthrix parvicella", a filamentous bacteria from activated sludge sewage treatment plants. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**: 344-346.

- Blackall, L.L. (1999) Bulking en *The Microbiology of Activated Sludge*. Seviour, R.J., y Blackall, L. (eds). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 147-159.
- Blackall, L.L., Seviour, E.M., Bradford, D., Rossetti, S., Tandoi, V., y Seviour, R.J. (2000) 'Candidatus Nostocoida limicola', a filamentous bacterium from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 703-709.
- Blackall, L.L., Crocetti, G., Saunders, A.M., y Bond, P.L. (2002) A review and update of the microbiology of enhanced biological phosphorus removal in wastewater treatment plants. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**: 681-691.
- Blackbeard, J.R., Ekama, G.A., y Marais, G.V.R. (1986a) A survey of bulking and foaming activated sludge plants in South Africa. *Journal of the Water Pollution Control Federation* **85**: 90-100.
- Blackbeard, J.R., Gabb, D.M.D., Ekama, G.A., y Marais, G.V.R. (1988) Identification of filamentous organisms in nutrient removal activated sludge plants in South Africa. *Water SA* **14**: 1-18.
- Bloem, J., Starink, M., Bär-Gilissen, M.J.B., y Cappenberg, T.E. (1988) Protozoan grazing, bacterial activity, and mineralization in two-stage continuous cultures. *Applied and Environmental Microbiology* **54**: 3113-3121.
- Bock, E., Koops, H.P., Ahlers, B., y Harms, H. (1992) Oxidation of inorganic nitrogen compounds as energy source en *The prokaryotes*. Balows, H., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., y Schleifer, K.H. (eds). New York: Springer Verlag, pp. 414-430.
- Bock, E., y Wagner, M. (2001) Oxidation of inorganic nitrogen compounds as an energy source en *The Prokaryotes*. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., y Stackebrandt, E. (eds). New York: Springer Verlag, pp. 457-495.
- Borrás, L. (2008) *Técnicas microbiológicas aplicadas a la identificación y cuantificación de organismos presentes en sistemas EBPR*. Tesis. Valencia: Universitat Politècnica de València.
- Bradford, D., Hugenholtz, P., Seviour, E.M., Cunningham, M.A., Stratton, H.M., Seviour, R.J., y Blackall, L.L. (1996) 16S rRNA analysis obtained from gram negative, filamentous bacteria micro-manipulated from activated sludge. *Systematic and Applied Microbiology* **19**: 334-343.
- Bray, J.R., y Curtis, J.T. (1957) Ordination of the upland forest community of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs* **27**: 325-349.
- Brigmon, R.L., Bitton, G., Zam, S.G., Martin, H.W., y O'brien, B. (1994a) Identification, enrichment, and isolation of *Thiothrix* spp. from environmental samples. *Current Microbiology* **28**: 243-246
- Brigmon, R.L., Martin, H.W., Morris, T.L., Bitton, G., y Zam, S.G. (1994b.) Biogeochemical ecology of *Thiothrix* spp. in underwater limestone caves. *Geomicrobiology Journal* **12** (3): 141-159.
- Brown, T.J. (1965) A study of the protozoa in a diffused-air activated-sludge plant. *Water Pollution Control* **64**: 375-378.

- Buali, A.M., y Horan, N.J. (1989) Variable morphology in certain filamentous bacteria and implication of this for theories of activated sludge bulking. *Environmental Technology Letters* **10**: 941-950.
- Burgess, J.E., Mayhew, M.E., Stephenson, T., y Clark, I.A. (2002) Assessment of microbial populations in activated sludge using an organism diversity index. *Journal of the Chartered Institution of Water and Environmental Management* **16**(1): 40-45.
- Bux, F., y Kasan, H.C. (1994) A microbiological survey of ten activated sludge plants. *Water SA* **20**: 61-71.

C

- Cairns, W., Cooper, D., Zajic, J., Wood, J., y Kosaric, N. (1982) Characterization of *Nocardia amarae* as a potent biological coalescing agent of water-oil emulsions. *Applied and Environmental Microbiology* **43**: 362-366.
- Calvo, S., Zornoza, A., y Alonso J.L. (2016) Limitación en la identificación convencional del morfotipo *Nostocoida limicola* II en fangos activos. *Tecnoagua* **18**: 40-49.
- Canals, O., Salvadó, H., Auset, M., Hernández, C., y Malfeito, J.J. (2013) Microfauna communities as performance indicators for an A/O Shortcut Biological Nitrogen Removal moving-bed biofilm reactor. *Water Research* **47**: 3141-3150.
- Carbonell, E., Denis, J.B., Calvo, R., González, F., y Pruñosa, V. (1983) *Regresión Lineal: un Enfoque Conceptual y Práctico*. España: Monografías INIA, 188 pp.
- Carlsson, P., y Caron, D. A. (2001) Seasonal variation of phosphorus limitation of bacterial growth in a small lake. *Limnology and Oceanography* **46**: 108-120.
- Carr, E.L., Eales, K.L., y Seviour, R.J. (2006) Substrate uptake by *Gordonia amarae* in activated sludge foams by FISH-MAR. *Water Science and Technology* **54**(1): 39-45.
- Carucci, A., Majone, M., Ramadori, R., y Rossetti, S. (1994) Dynamics of phosphorus and organic substrates in anaerobic and aerobic phases of a sequencing batch reactor. *Water Science and Technology* **30**(6): 237-246.
- Catalán, J. (1997). *Depuradoras "Bases Científicas"*. Madrid: BELLISCO, Librería Editorial, 400 pp.
- Cavalier-Smith, T. (1998) A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews* **73**(3): 203-266.
- Cavalier-Smith, T. (2002) The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of protozoa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 297-354.
- Cech, J.S., Hartman, P., y Macek, M. (1994) Bacteria and Protozoa Population Dynamics in Biological Phosphate Removal Systems. *Water Science and Technology* **29**(7): 109-117.
- Cech, J.S., y Hartman, P. (1993) Competition between polyphosphate and polysaccharide accumulating bacteria in enhanced biological phosphate removal systems. *Water Research* **27**: 1219-1225.

- Chen, S., Xu, M., Cao, H., Zhu, J., Zhou, K., Xu, J., Yang, X., Gan, Y., Liu, W., Zhai, J., y Shao, Y. (2004) The activated-sludge fauna and performance of five sewage treatment plants in Beijing, China. *European Journal of Protistology* **40**: 147-152.
- Chernousova, E., Gridneva, E., Grabovich, M., Dubinina, G., Akimov, V., Rossetti, S., y Kuever, J. (2009) *Thiothrix caldifontis* sp.nov. and *Thiothrix lacustris* sp. nov., gammaproteobacteria isolated from sulfide springs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**: 3128-3125.
- Chierici, E., y Madoni, P. (1991). Comparative analysis of the activated microfauna in small municipal plants en *Biological Approach to Sewage Treatment Process: Current Status and Perspectives*. Madoni, P. (ed). Perugia: Centro Bazzucchi, pp. 83-87.
- Chua, H., y Le, K.Y. (1994) A survey of filamentous foaming in activated-sludge plants in Hong-Kong. *Water Science and Technology* **30**(11): 251-254.
- Chudoba, P., y Pujol, R. (1994) Kinetic selection of microorganisms by means of a selector – twenty years of progress: history, practice and problems. *Water Science and Technology* **29**(7): 177-180.
- Chun, J., Blackall, L., Kang, S., Hah, Y., y Goodfellow, M. (1997) A proposal to reclassify *Nocardia pinensis* Blackall *et al.* as *Skermania piniformis* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**: 127-131.
- Cingolani, L., Cossignani, M., y Miliani, R. (1991) The role of microfauna in the prediction and control of the activated sludge disfunctions of a municipal plant en *Biological Approach to Sewage Treatment Process: Current status and perspectives*. Perugia, pp. 93-96.
- Cingolani, L., Cossignani, M., y Miliani, R. (1992) Relationships between population dynamics and operating parameters in an activated sludge-plant by statistical analysis. *Water Science and Technology* **25**(4-5): 339-400.
- Clarke, K. J. (2003) *Guide to the Identification of Soil Protozoa - Testate Amoebae*. Soil Biodiversity Programme Research Report N° 4, FBA Special Publication, Ambleside.
- Clarke, R.K. (1993) Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Ecology* **18**: 117-143.
- Clarke, K.R., Gorley, R.N, Somerfield, P.J., y Warwick, R.M (2014). *Change in Marine Communities: an Approach to Statistical Analysis and Interpretation*, 3rd edition. PRIMER-E, Plymouth, 260pp.
- Clarke, K.R, y Gorley, R.N. (2015) *PRIMER v7: User Manual/Tutorial*. PRIMER-E, Plymouth, 296pp.
- Clay, E. (1964) The fauna and flora of sewage processes. 2. Species list. I.C.I. Ltd, Paints Division, Research Dept Memorandum PVM 45/A/732.5.
- Cole, J.R., Chai, B., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam, S.A., McGarrell, D.M. *et al.* (2005) The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* **33**: D294-296.
- Coleman, D.C, Cole, C.V., Hunt, H.V., y Klein, D.A. (1978) Trophic interactions in soils as they affect energy and nutrient dynamics: Part I, introduction. *Microbial Ecology* **4**: 345-349.

- Cornfield, J., y Tukey, J.W. (1956) Average values of mean squares in factorials. *Annals of Mathematical Statistics* **27**: 907-949.
- Cossignani, M., Cingolani, L., Giacché, L., y Miliani, R. (1992) Investigations on activated sludge microfauna and treatment plant disfunctions. *Water Science and Technology* **26**(9-11): 2519-2522.
- Crocetti, G.R., Hugenholtz, P., Bond, P.L., Schuler, A., Keller, J., Jenkins, D., y Blackall, L.L. (2000) Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 1175-1182.
- Curds, C.R. (1963) The flocculation of suspended matter by *Paramecium caudatum*. *Journal of General Microbiology* **33**: 357-363.
- Curds, C.R., Cockburn, A., y Vandyke, J.M. (1968) An experimental study of the role of the ciliated protozoa in the activated sludge process. *Water Pollution Control* **67**: 312-329.
- Curds, C.R., y Fey, G.J. (1969) The effect of ciliated protozoa on fate of *Escherichia coli* in the activated sludge process. *Water Research* **3**: 853-867.
- Curds, C.R., y Cockburn, A. (1970a) Protozoa in biological sewage-treatment processes I. A survey of the protozoan fauna of British percolating filters and activated-sludge plants. *Water Research* **4**: 225-236.
- Curds, C.R., y Cockburn, A. (1970b) Protozoa in biological sewage-treatment processes II. Protozoa as indicators in the activated-sludge process. *Water Research* **4**: 237-249.
- Curds, C.R. (1973) The role of protozoa in the activated-sludge process. *American Zoologist* **13**: 161-169.
- Curds, C.R. (1975) Protozoa en *Ecological Aspects of Used Water Treatment*, Vol I. Curds, C.R., y Hawkes, H.A. (eds). London: Academic Press, pp. 203-268.
- Curds, C.R. (1977) Microbial interactions involving protozoa en *Aquatic Microbiology*. Droop, M.R., y Jannasch, H.W. (eds). London: Academic Press, pp. 114-176.
- Curds, C.R. (1982) The ecology and role of protozoa in aerobic sewage treatment processes. *Annual Review of Microbiology* **36**: 27-46.
- Curds, C.R y Hawkes, H.A. (1983) *Ecological Aspects of Used Water Treatment*, vol. 3. New York: Academic Press.
- Curds, C.R., Roberts, D.M., Salvadó, H., y Warren, A. (2008) *An Interactive User-friendly Guide to the Identification of Sewage Ciliates*. CD-ROM. London: Natural History Museum.
- Cyrus, A., y Sladka, A. (1970) Several interesting organisms present in activated sludge. *Hydrobiologia* **35**: 383-396.

D

- da Motta, M., Pons, M.N., Vivier, H., Amaral, A.L., Ferreira, E.C., Roche, N., y Mota, M. (2001) The study of protozoa population in wastewater treatment plants by image analysis. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **18**: 103-111.

- Daims, H., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H., Schleifer, K.H., y Wagner, M. (2001) *In situ* characterization of *Nitrospira*-like nitrite oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 5273-5284.
- Davenport, R.J., Curtis, T.P., Goodfellow, M., Stainsby, F.M., y Bingley, M. (2000) Quantitative use of fluorescent *in situ* hybridization to examine relationships between mycolic acid-containing actinomycetes and foaming in activated sludge plants. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 1158-1166.
- de los Reyes, M.F. (1997) Detection and quantification of *Gordonia amarae* strains in foaming activated sludge systems using a phylogenetic approach. PhD thesis, *Environmental Science in Civil Engineering*. Urbana University of Illinois.
- de los Reyes, M.F., de los Reyes, F.L., Hernandez, M., y Raskin, L. (1998) Identification and quantification of *Gordonia amarae* strains in activated sludge systems using comparative rRNA sequence analysis and phylogenetic hybridization probes. *Water Science and Technology* **37**(4-5): 521-525.
- de los Reyes, F.L., Rothauszky, D., y Raskin, L. (2002) Microbial community structures in foaming and nonfoaming full-scale wastewater treatment plants. *Water Environment Research* **74**(5): 437-450.
- de los Reyes, F.L. (2010) Foaming en *Microbial Ecology of Activated Sludge*. Seviour, R., y Nielsen, P.H. (eds). London: IWA Publishing, pp. 215-258.
- DeLong, E.F., Wickham, G.S., y Pace, N.R. (1989) Phylogenetic stains – rRNA-based probes for the identification of single cells. *Science* **243**: 1360-1363.
- Dhaliwal, B. (1979) *Nocardia amarae* and activated sludge foaming. *Journal of the Water Pollution Control Federation* **51**: 344-350.
- Di Marzio, W.D. (2002) First results from a screening of filamentous organisms present in Buenos Aires's activated sludge plants. *Water Science and Technology* **46**(1-2): 119-122.
- Ding, L.X., y Yokota, A. (2004) Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov and *Herbaspirillum putei* sp nov for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 2223-2230.
- Doohan, M. (1975) Rotífera en *Ecological Aspects of Use-water Treatment: The Organism and their Ecology*, vol. 1. Curds, C.R., y Hawkes, H.A. (eds). London: Academic press, pp. 289-304.
- Droste, R.L. (1997) *Theory and Practice of Water and Wastewater Treatment*. Canada: Jhon Wiley and Sons, Inc.
- Drakides, C. (1978) L'observation microscopique des Boues activées appliquée à la surveillance des installations d'épuration: technique d'étude et interprétation. T.S.M. L'eau, **2**: 85-98.

- Drzewicki, A., Kowalska, E., Pajdak-Stós, A., Fiałkowska, E., Kocerba-Soroka, W., Sobczyk, L., y Fyda, J. (2015) Experimental Attempt at Using *Lecane inermis* Rotifers to Control Filamentous Bacteria Eikelboom Type 0092 in Activated Sludge. *Water Environment Research* **87**(3): 205-210.
- Drzewicki, A., y Kulikowska, D. (2011) Limitation of Sludge Biotic Index application for control of a wastewater treatment plant working with shock organic and ammonium loadings. *European Journal of Protistology* **47**: 287-294.
- Dubber, D., y Gray, N.F. (2009) Enumeration of protozoan ciliates in activated sludge: Determination of replicate number using probability. *Water Research* **43**: 3443-3452.
- Dubber, D., y Gray, N.F. (2011a) The influence of fundamental design parameters on ciliates community structure in Irish activated sludge system. *European Journal of Protistology* **47**: 274-286.
- Dubber, D., y Gray, N.F. (2011b) The effect of anoxia and anaerobia on ciliate community in biological nutrient removal systems using laboratory-scale sequencing batch reactors (SBRs). *Water Research* **45**: 2213-2226.
- Duchene, P. (1991) The most significant protozoa and metazoa currently found in activated sludge en *Biological approach to sewage treatment process: current status and perspectives*. Madoni, P. (ed). Perugia, pp. 33-37.
- Duchene, P. (1994) Biological foams: the cause-effect relationship, test results and combat strategy. *Water Science and Technology* **29**(7): 239-247.

E

- Eales, K., Nielsen, J.L., Kragelund, C., Seviour, R., y Nielsen, P.H. (2005) The *in situ* physiology of pine tree like organisms (PTLO) in activated sludge foams. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* **33**: 203-209.
- Eales, K.L., Nielsen, J.L., Seviour, E.M., Nielsen, P.H., y Seviour, R.J. (2006) The *in situ* physiology of *Skermania piniformis* in foams in Australian activated sludge plants. *Environmental Microbiology* **8**: 1712-1720.
- Eberl, L., Schulze, R., Ammendola, A., Geisenberger, O., Erhart, R., Sternberg, C., Molin, S., y Amann, R. (1997) Use of green fluorescent protein as a marker for ecological studies of activated sludge communities. *FEMS Microbiology Letters* **149**: 77-83.
- Eikelboom, D.H. (1975) Filamentous organisms observed in activated sludge. *Water Research* **9**: 365-388.
- Eikelboom, D.H. (1977) Identification of filamentous organisms in bulking activated sludge. *Progress in Water Technology* **8**: 153-161.
- Eikelboom, D.H., y Buijsen, H.J.J. (1981) *Microscopic Sludge Investigation Manual*. Delft: TNO Research Institute of Environmental Hygiene.
- Eikelboom, D.H., y van Buijsen, H.J.J. (1983) *Microscopic Sludge Investigation Manual*. Delft: TNO Research Institute of Environmental Hygiene.
- Eikelboom, D.H. (1994) The Microthrix-parvicella puzzle. *Water Science and Technology* **29**(7): 271-279.

- Eikelboom, D.H., Andreadakis, A., y Andreasen, K. (1997) Survey of the filamentous population in nutrient removal plants in four European countries en *Proceedings 2nd Int. Conf. on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes*. Berkeley, California, pp. 171-179.
- Eikelboom, D.H., Andreadakis, A., y Andreasen, K. (1998) Survey of filamentous populations in nutrient removal plants in four European countries. *Water Science and Technology* **37**(4-5): 281-289.
- Eikelboom, D. (2000) *Process Control of Activated Sludge Plant by Microscopic Investigations*. London: IWA Publishing.
- Eikelboom, D., y Geurkink, B. (2002) Filamentous microorganisms observed in industrial activated sludge plants. *Water Science and Technology* **46**(1-2): 535-542.
- Eikelboom, D. (2006) *Identification and Control of Filamentous Micro-organisms in Industrial Wastewater Treatment Plants* (CD). London: IWA Publishing.
- Ekama, G.A., Barnard, J.L., Gunthert, F.W., Krebs, P., McCorquodale, J.A., Parker, D.S., y Wahlberg, E.J. (1997) Secondary Settling Tanks: Theory, Modelling, Design and Operation. *Scientific and Technical Report No. 6, LAWQ London*.
- Enzinger, R.M., y Cooper, R.C. (1976) Role of bacteria and protozoa in the removal of *Escherichia coli* from estuarine waters. *Applied and Environmental Microbiology* **31**: 758-763.
- Esteban, G., Téllez, C., y Bautista, L.M. (1990) Effects of habitat quality on ciliated protozoa communities in sewage treatment plants. *Environmental Technology* **12**(4): 381-386.
- Esteban, G., Téllez, C., y Bautista, L.M. (1991) Dynamics of ciliated protozoa communities in activated-sludge process. *Water Research* **25**: 967-972.

F

- Fairbrother, T.H., y Renshaw, A. (1922) The relation between chemical constitution and antiseptic action in the coal tar dyestuffs. *Journal of the Society of Chemical Industry* **41**: 134-138.
- Farquhar, G.J., y Boyle, W.C. (1971a) Occurrence of filamentous microorganisms in activated sludge. *Journal of the Water Pollution Control Federation* **43**: 779-798.
- Farquhar, G.J., y Boyle, W.C. (1971b) Identification of filamentous microorganisms in activated sludge. *Journal of the Water Pollution Control Federation* **43**: 604-622.
- Fenchel, T. (1980) Suspension feeding in ciliated protozoa : functional response and particle size selection. *Microbial Ecology* **6**: 1-11.
- Fenchel, T. (1986) Protozoan filter feeding. *Progress in Protozoology* **1**: 65-113.
- Fenchel, T. (1987) *Ecology of Protozoa*. Berlin: Springer-Verlag, 196 pp.
- Fernández-Galiano, D. (1976) Silver impregnation of ciliated protozoa: procedure yielding good results with the pyridinated silver carbonate method. *Transactions of the American Microscopical Society* **95**: 557-560.

- Fernández-Galiano, D. (1994) The ammoniacal silver carbonate method as a general procedure in the study of protozoa of sewage (and other) waters. *Water Research* **28**: 495-496.
- Fernández-Galiano, D., Guinea, A., Serrano, S., Martín, M., Arregui, L., Rodríguez, B., Campos, I., Calvo, P., y Suarez, J. (1996) *Guía Práctica de Identificación de Protozoos Ciliados en Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales por Lodos Activados de la Comunidad Autónoma de Madrid*. Madrid: Dpto. Microbiología, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid.
- Ferrer-Roglán, M. (2014). *Identificación y cuantificación del morfotipo Haliscomenobacter hydrophila formador de bulking mediante la técnica FISH y estudio de su relación con los parámetros operacionales y físico-químicos en EDAR de la Comunidad Valenciana*. Tesina de Máster. Valencia: Universitat Politècnica de València.
- Fialkowska, E., Fyda, J., Pajdak-Stós, A., y Wiackowski, K. (2005) *Activated sludge: Biology and Microscopic Analysis*. Kraków: Impuls Publishers, (in Polish).
- Fialkowska, E., y A. Pajdak-Stós. (2008) The role of *Lecane* rotifers in activated sludge bulking control. *Water Research* **42**: 2483-2490.
- Field, J.G., Clarke, K.R., y Warwick., R.M. (1982) A practical strategy for analyzing multispecies distribution patterns. *Marine Ecology Progress Series* **8**: 37-52.
- Filipe, C.D.M., Daigger, G.T., y Grady, C.P.L. (2001) Effects of pH on the rates of aerobic metabolism of phosphate-accumulating and glycogen-accumulating organisms. *Water Environment Research* **73**: 213-222.
- Foissner, W., Blatterer, H., Berger, H., y Kohmann, F. (1991) Ciliophora, Oligotrichi, Hypotrichia, Colpodea en *Taxonomische und Ökologische Revision der Ciliaten des Saprobien-systems*: Informationsberichte des Bayer. Landesamtes für Wasserwirtschaft 1/91, p. 471.
- Foissner, W., Berger, H. y Kohmann, F. (1992) Peritrichia, Heterotrichida, Odontostomatida en *Taxonomische und Ökologische Revision der Ciliaten des Saprobien-systems*: Informationsberichte des Bayer. Landesamtes für Wasserwirtschaft 1/92, p. 502.
- Foissner, W., Berger, H., y Kohmann, F. (1994) Hymenostomata, Protomatida, Nassulida en *Taxonomische und Ökologische Revision der Ciliaten des Saprobien-systems*: Informationsberichte des Bayer. Landesamtes für Wasserwirtschaft 1/94, p. 548.
- Foissner, W., Berger, H., Blatterer, H., y Kohmann, F. (1995) Gymnostomata, Loxodes, Suctoria en *Taxonomische und Ökologische Revision der Ciliaten des Saprobien-systems*: Informationsberichte des Bayer, Landesamtes für Wasserwirtschaft 1/95. p. 540.
- Foissner, W., y Berger, H. (1996) A user-friendly guide to the ciliates (Protozoa, Ciliophora) commonly used by hydrobiologists as bioindicators in rivers, lakes, and waste waters, with notes on their ecology. *Freshwater Biology* **35**: 375-482.

- Foot, R.J. (1992) The effects of process control parameters on the composition and stability of activated sludge. *Journal of the Institute and Water Environmental Management* **6**(2): 215-228.
- Forster, C.F. (1992) Oils, fats and greases in wastewater treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **55**: 402-404.
- Foot, R.J., Kocianova, E., Forster, C.F., y Wilson, A.J. (1993) An examination into the structure of stable foams formed on activated-sludge plants. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **56**: 21-25.
- Franz, A., y Matsche, N. (1994) Investigation of a bacteria-enzyme additive to prevent foaming in activated sludge plants. *Water Science and Technology* **29**(7): 281-284.
- Fried, J., Ludwig, W., Psenner, R., y Schleifer, K.H. (2002) Improvement of ciliate identification and quantification: a new protocol for fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in combination with silver stain techniques. *Systematic and Applied Microbiology* **25**: 555-571.
- Frigon, D., Michael Guthrie, R., Timothy Bachman, G., Royer, J., Bailey, B., y Raskin, L. (2006) Long-term analysis of a full-scale activated sludge wastewater treatment system exhibiting seasonal biological foaming. *Water Research* **40**: 990-1008.
- Frölund, B., Palmgren, R., Keiding, K., y Nielsen, P.H. (1996) Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research* **30**: 1747-1758.
- Fyda, J., Babko, R., Fialkowska, E., Pajdak-Stós, A., Kocerba-Soroka, W., Sobczyk, M., y Sobczyk, Ł. (2015) Effect of high levels of the rotifer *Lecane inermis* on the ciliate community in laboratory-scale sequencing batch bioreactors (SBRs). *European Journal of Protistology* **51**(5): 470-479.

G

- García-González, M.C. (2003) *Caracterización de las comunidades microbianas y de la microfauna en sistemas para la eliminación simultánea de carbono y nutrientes en aguas residuales*. Tesis. Valladolid: Universidad de Valladolid. Facultad de Ciencias.
- Garrity, G.M., y Holt, J.G. (2001) Phylum BVI. *Chloroflexi* Phy. Nov. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. Boone, D.R., y Castenholz, R.W. (eds). New York: Springer-Verlag, pp. 426-446.
- Gauch, H.G. (1982). *Multivariate Analysis in Community Ecology*. Cambridge University Press, 312 pp.
- Gerardi, M. (2002) *Nitrification and Denitrification in the Activated Sludge Process*. New York: Wiley-Interscience.
- Ghyoot, W., y Verstraete, W. (1999) Reduced sludge production in a two-stage membrane-assisted bioreactor. *Water Research* **34**: 205-215.
- Gijzen, H.J. (2001). Anaerobes, Aerobes and Phototrophs. A winning team for wastewater management. *Water Science and Technology* **44**(8): 123-132.

- Ginoris, Y.P., Amaral, A.L., Nicolau, A., Coelho, M.A.Z., y Ferreira, E.C. (2007) Development of an image analysis procedure for identifying protozoa and metazoa typical of activated sludge system. *Water Research* **41**: 2581-2589.
- Giovannoni, S.J., Schabtach, E., y Castenholz, R.W. (1987). *Isosphaera pallida* gen. and comb. nov., a gliding, budding eubacterium from hot springs. *Archives of Microbiology* **147**: 276-284.
- Gioria, M., Bacaro, G., y Feehan, J. (2010) Identifying the drivers of pond biodiversity: the agony of model selection. *Community Ecology* **11**(2): 179-186.
- Goddard, A.J., y Forster, C.F. (1986) Surface tension of activated sludges in relation to the formation of stable foams. *Microbios* **43**: 29-46.
- Goddard, A.J., y Forster, C.F. (1987a) Stable foams in activated sludge plants. *Enzyme and Microbial Technology* **9**: 164-168.
- Goddard, A.J., y Forster, C.F. (1987b) A further examination into the problem of stable foams in activated sludge plants. *Microbios* **50**: 29-42.
- Goddard, A.J., y Forster, C.F. (1991). Microbial lipids and stable foam formation in the activated sludge process. *Microbios* **66**: 133-142.
- Goi, M. (1994) An experimental study to suppress scum formation accompanying the abnormal growth of *Nocardia* by adding ozone in the aeration tank. *Water Science and Technology* **30**(11): 231-234.
- Goodey, J.B., Franklin, M.T., y Hooper, D.J. (1965) *The T. Goodey's Nematode Parasites of Plants Catalogued under their Host*. Comm. Agric. Bur. Farnham Royal Bucks, England, 214 pp.
- Goodfellow, M., Chun, J., Stubbs, S., y Toboli, A.S. (1994) Transfer of *Nocardia amarae* Lechevalier and Lechevalier 1974 to the genus *Gordona* as *Gordona amarae* comb. nov. *Letters in Applied Microbiology* **19**: 401-405.
- Gower, J.C. (1966) Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika* **53**: 325-338.
- Grady, C.P. (1989). Dinamic modeling of suspended growth biological wastewater treatment processes en *Dynamic Modeling and Expert Systems in Wastewater Engineering*. Patry, G., y Chapman, D. (eds). Chelsea, Michigan: Lewis Publishers, pp. 1-38.
- Gray, N.D., Miskin, I.P., Kornilova, O., Curtis, T.P., y Head, I.M. (2002) Occurrence and activity of *Archaea* in aerated activated sludge wastewater treatment plants. *Environmental Microbiology* **4**: 158-168.
- Gray, N.F. (2004) *Biology of Wastewater Treatment*. Imperial College Press, London.
- Güde, H. (1979) Grazing by protozoa as selection factor for activated sludge bacteria. *Microbial Ecology* **5**: 225-237.
- Guo, F., y Zhang, T. (2012) Profiling bulking and foaming bacteria in activated sludge by high throughput sequencing. *Water Research* **46**: 2772-2782.

Gurijala, K.R., y Alexander, M. (1990) Effect of growth rate and hydrophobicity on bacteria surviving protozoan grazing. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 1631-1635.

H

Hahn, M.W., y Höfle, M.G. (2001) Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* **35**: 113-121.

Hamm, A. (1964) Untersuchungen über die Ökologie und Variabilität von *Aspidisca costata* (Hypotricha) in Belebtschlamm. *Archiv für Hydrobiologie* **60**: 268-339.

Hänel, K. (1979) Systematik and Ökologie der farblosen Flagellaten des Abwassers. *Archives of Protistology* **121**: 73-127.

Hanson, C., Atasi, K., Packman, J., Singleton, E., y Glymph, A. (1992) A case study relating activated sludge nutrient loadings to the appearance of *Nocardia* spp. foaming. *Water Science and Technology* **26**(9): 2497-2500.

Hao, O.J., Strom, P.F., y Wu, Y.C. (1988) A review of the role of *Nocardia*-like filaments in activated-sludge foaming. *Water SA* **14**: 105-110.

Hao, X., Heijnen, J.J., y van Loosdrecht M.C. (2002) Sensitivity Analysis of a Biofilm Model describing a one-stage completely autotrophic nitrogen removal (CANON) process. *Biotechnology and Bioengineering* **77**(3): 266-277.

Hartley, H.O. (1967) Expectations, variances and covariances of ANOVA mean squares by 'synthesis'. *Biometrics* **23**: 105-114.

Hausman, K., Hülsmann, N., y Radek, R. (2003) *Protistology*, 3rd edn., E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Overmiller), Stuttgart.

Henze, M., Harremoës, P., la Cour Jansen, J., y Arvin, E. (1997) *Wastewater Treatment*. Berlin.: Springer-Verlag.

Hernández, M. (1994) The fate of *Nocardia* in anaerobic digestion. Civil Engineering. Berkeley: University of California.

Hernández Muñoz, A., Hernández Lehman, A., y Galan, P. (1996) *Manual de Depuración URALITA: Sistemas para Depuración de Aguas Residuales en Núcleos de hasta 20.000 Habitantes*. Madrid: Editorial Paraninfo, 427 pp.

Hesselsoe, M., Nielsen, J.L., Roslev, P., y Nielsen, P.H. (2005) Isotope labeling and microautoradiography and active heterotrophic bacteria on the basis of assimilation of ¹⁴CO₂. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 646-655.

Hünerberg, K., Sarfert, F., y Frenzel, H.J. (1970) Ein Beitrag zum Problem "Blähschlamm". *Gas-Wasserfach Wasser-Abwasser* **111**: 7-10

Hill, M.O. (1974) Correspondence analysis: a neglected multivariate method. *Journal of Applied Statistics* **23**: 340-354.

Hiraoka, M., y Tsumura, K. (1984) Suppression of actinomycete scum production-a case study at Senboku wastewater treatment plant, Japan. *Water Science and Technology* **16**(10-11): 83-90.

- Hoffman, R.L., y Atlas, R.M. (1987) Measurement of the effects cadmium stress on protozoan grazing of bacteria (bacterivory) in activated sludge by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* **53**: 2440-2444.
- Hollocher, T.C., Tate, M.E., y Nicholas, D.J. (1981) Oxidation of ammonia by *Nitrosomonas europaea*. Definite ¹⁸O-tracer evidence that hydroxylamine formation involves a monooxygenase. *Journal of Biological Chemistry* **256**: 10834-10836.
- Holm, N.G., Gliesche, C.G., y Hirsch, P. (1996) Diversity and structure of *Hyphomicrobium* populations in a sewage treatment plant and its adjacent receiving lake. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 522-528.
- Holmström, H., Bosander, J., Dahlberg, A., Dillner-Westlund, A., Flyborg, L., y Jokinen, K. (1996) Severe bulking and foaming at the Himmerfjär den WWTP. *Water Science and Technology* **33**(12): 127-135.
- Holubar, P., Grudke, T., Moser, A., Strenn, B., y Braun, R. (2000) Effects of bacterivorous ciliated protozoans on degradation efficiency of a petrochemical activated sludge process. *Water Research* **34**: 2051-2060.
- Horan N.J. (1990) *Biological Wastewater Treatment Systems. Theory and Operation*. Chichester: John Wiley and Sons.
- Horan, N.J. (1992) The use of protozoa to indicate changes in the performance of activated-sludge plants – Reply. *Water Research* **26**: 1148.
- Hotelling, H. (1933) Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *British Journal of Educational Psychology* **24**: 417-441.
- Howarth, R., Unz, R.F., Seviour, E.M., Seviour, R.J., Blackall, L.L., Pickup, R.W., Jones, J.G., Yaguchi, J., y Head, I.M. (1999) Phylogenetic relationships of filamentous sulfur bacteria (*Thiothrix* spp. and Eikelboom type 021N bacteria) isolated from wastewater treatment plants and description of *Thiothrix eikelboomii* sp. nov. *Thiothrix unzii* sp. nov., *Thiothrix fructosivorans* sp. nov. and *Thiothrix defluvii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**: 1817-1827.
- Hu, B., Qi, R., An, W., y Yang, M. (2012) Responses of protists different feeding habits to the changes of activated sludge conditions: A study based on biomass data. *Journal of environmental Sciences* **24**(12): 2127-2132.
- Hu, B., Qi, R., An, W., Xu, M., Zhang, Y., Bai, X., Bao, H., Wen, Y., Gu, J., y Yang, M. (2013a) Dynamics of the microfauna community in a full-scale municipal wastewater treatment plant experiencing sludge bulking. *Journal of Environmental Sciences* **25**(7): 1379-1385.
- Hu, B., Qi, R., An, W., y Yang, M. (2013b) Systematic analysis of microfauna indicator values for treatment performance in a full-scale municipal wastewater treatment plant. *Journal of Environmental Sciences* **25**(7): 1379-1385.
- Hu, Z.Q., Ferraina, R.A., Ericson, J.F., MacKay, A.A., y Smets, B.F. (2005) Biomass characteristics in three sequencing batch reactors treating a wastewater containing synthetic organic chemicals. *Water Research* **39**: 710-20.

Hugenholtz, P., Goebel, B.M., y Pace, N.R. (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* **180**: 4765-4774.

Hugenholtz, P., Tyson, G.W., Webb, R.I., Wagner, A.M., y Blackall, L.L. (2001) Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain Bacteria with no known pure-culture representatives. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 411-419.

I

Inamori, Y., Kuniyasu, Y., Sudo, R., y Koga, M. (1991) Control of the Growth of Filamentous Microorganisms Using Predacious Ciliated Protozoa. *Water Science and Technology* **23**: 963-971.

ISO, 2003. Water Quality: Determination of Biochemical Oxygen Demand after n Days (BOD_n). Part 1: Dilution and Seeding Method with Allylthiourea Addition. ISO 5815-1:2003. International Organization for Standardization, Geneva.

Iwahori, K., Wang, M., Taki, H., y Fujita, M. (1995) Comparative studies on utilization of fatty acids and hydrocarbons in *Nocardia amarae* and *Rhodococcus* spp. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **79**: 186-189.

Iwahori, K., Tokutomi, T., Miyata, N., y Fujita, M. (2001) Formation of stable foam by the cells and culture supernatant of *Gordonia (Nocardia) amarae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **92**: 77-79.

J

James, F.C., y McCulloch, C.E. (1990) Multivariate analysis in ecology and systematics: panacea or pandora's box?. *Annual Review of Ecology and Systematics* **21**: 129-166.

Janssen, P.H., Evers, S., Rainey, F.A., Weiss, N., Ludwig, W., Harfoot, C.G., y Schink, B. (1996) *Lactosphaera* gen. nov., a new genus of lactic acid bacteria and transfer of *Ruminococcus pasteurii* Schink 1984 to *Lactosphaera pasteurii* comb. nov. *International journal of systematic bacteriology* **45**: 565-571.

Jaromin-Gleń, K., Babko, R., Łagód, G., y Sobczuk, H. (2013) Community composition and abundance of protozoa under different concentration of nitrogen compounds at "Hajdow" wastewater treatment plant. *Ecological Chemistry and Engineering S* **20**(1): 127-139.

Jenkins S.H. (1942) The role of protozoa in the activated sludge process. *Nature* **150**: 607.

Jenkins, D., Richard, M.G. y Daigger, G.T. (1984) *Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming*. Pretoria: Water Research Commission of SA.

Jenkins, D. (1992) Towards a comprehensive model of activated sludge bulking and foaming. *Water Science and Technology* **25**(6): 215-230.

Jenkins, D., Richard, M., y Daigger, G. (1993) *Manual on Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming*. Chelsea, Michigan: Lewis Publishers.

- Jenkins, D., Richard, M.G., y Daigger, G.T. (2004) *Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking, Foaming, and other Solids Separation Problems*. London: IWA Publishing.
- Jiang, J.G., y Shen, Y.F. (2003) Development of a biotic index using the correlation of protozoan communities with chemical water quality. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **37**(4): 777-792.
- Jiang, X-T., Guo, F., y Zhang, T. (2016) Population dynamics of bulking and foaming bacteria in a full-scale wastewater treatment plant over five years. *Scientific Reports* **6**: 24180.
- Johnson, J.W.H. (1914) A contribution to the biology of sewage disposal. Pt II. *Journal of Economic Biology* **9**: 127-164.
- Juretschko, S., Loy, A., Lehner, A., y Wagner, M. (2002) The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. *Systematic and Applied Microbiology* **25**: 84-99.
- Jürgens, K., Pernthaler, J., Schalla, S., y Amann, R. (1999) Morphological and compositional changes in a planktonic bacterial community in response to enhanced protozoan grazing. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 1241-1250.

K

- Kämpfer, P., Weltin, D., Hoffmeister, D., y Dott, W. (1995) Growth requirements of filamentous bacteria isolated from bulking and scumming sludge. *Water Research* **29**: 1585-1588.
- Kämpfer, P. (1997) Detection and cultivation of filamentous bacteria from activated sludge. *FEMS Microbiology Ecology* **23**: 169-181.
- Kappeler, J., y Gujer, W. (1994) Scumming due to actinomycetes: an uncalibrated simulation model. *Water Science and Technology* **29**(7): 285-288.
- Khan, A., y Forster, C. (1991) Aspects of the nutrition and the growth of *Rhodococcus rubra* in relation to the formation of stable foams. *Environmental Technology* **12**: 271-277.
- Kanagawa, T., Kamagata, Y., Aruga, S., Kohno, T., Horn, M., y Wagner, M. (2000) Phylogenetic analysis of an oligonucleotide probe development for Eikelboom type 021N filamentous bacteria isolated from bulking activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 5043-5052.
- Keiding, K., y Nielsen, P.H. (1997) Desorption of organic macromolecules from activated sludge: effect of ionic composition. *Water Research* **31**: 1665-1672.
- Keith, J.E. (2002) Molecular characterization of microbial populations in full-scale activated sludge plants and bioaugmentation sites en *Civil, Construction, and Environmental Engineering*. Raleigh, North Carolina: North Carolina State University, 98 pp.
- Kerley, S., y Forster, C.F. (1995) Extracellular polymers in activated sludge and stable foams. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **62**: 401-404.

- Kim, S.B., Goodfellow, M., Kelly, J., Saddler, G.S., y Ward, A.C. (2002) Application of oligonucleotide probes for the detection of *Thiothrix* spp. in activated sludge plants treating paper and board mill wastes. *Water Science and Technology* **46** (1-2): 559-564.
- Klatte, S., Rainey, F., y Kroppenstedt, R.M. (1994) Transfer of *Rhodococcus aichiensis* Tsukamura 1982, and *Nocardia amarae* Lachevalier 1974, to the genus *Gordona* as *Gordona aichiensis* comb. nov. and *Gordona amarae* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**: 769-773.
- Klimowicz, H. (1970) Microfauna of activated sludge. Part I. Assemblage of microfauna in laboratory models of activated sludge. *Acta Hydrobiologica* **12**: 357-376.
- Klimowicz, H. (1973) Microfauna of activated sludge. Part III. The effect of physico-chemical factors on the occurrence of microfauna in the annual cycle. *Acta Hydrobiologica* **15**: 167-188.
- Klimowicz, H. (1974) Biological studies of the sewage-treatment processes in the city of Torun. *Polish Archives of Hydrobiology* **21**: 291-299.
- Kocerba-Soroka, W., Fialkowska, E., Pajdak-Stós, A., Klimek, B., Kowalska, E., Drzewicki, A., Salvadó, H., y Fyda J. (2013) The use of rotifers for limiting filamentous bacteria Type 021N, a bacteria causing activated sludge bulking. *Water Science and Technology* **67**(7): 1557-1563.
- Kos, M., Wanner, J., Sorm, I., y Grau, P. (1992) R-D-N activated-sludge process. *Water Science and Technology* **25**(4-5): 151-160.
- Kowalska, E., Paturej, E., y Zielinska, M. (2014) Use of *Lecane* rotifers for limiting *Thiothrix* filamentous bacteria in bulking activated sludge in a dairy wastewater treatment plant. *Archives of Biological Sciences* **66**(4): 1371-1378.
- Kowalska, E., Paturej, E., y Zielinska, M. (2015) Use of *Lecane inermis* for control of sludge bulking caused by the *Haliscomenobacter* genus. *Desalination and Water Treatment* **57**(23): 1-8.
- Kragelund, C., Nielsen, J.L., Thomsen, T.R., y Nielsen, P.H. (2005) Ecophysiology of the filamentous *Alphaproteobacterium Meganema perideroedes* in activated sludge. *FEMS Microbiology Ecology* **54**: 111-122.
- Kragelund, C., Kong, Y., van der Waarde, J., Thelen, K., Eikelboom, D., Tandoi, V., Thomsen, T.R., y Nielsen, P.H. (2006) Ecophysiology of different filamentous *Alphaproteobacteria* in industrial wastewater treatment plants. *Microbiology* **152**: 3003-3012.
- Kragelund, C., Levantesi, C., Borger, A., Thelen, K., Eikelboom, D., Tandoi, V. *et al.* (2007a) Identity, abundance and ecophysiology of filamentous *Chloroflexi* species present in activated sludge treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology* **59**: 671-682.
- Kragelund, C., Remesova, Z., Nielsen, J.L., Thomsen, T.R., Eales, K., Seviour, R. *et al.* (2007b) Ecophysiology of mycolic acid-containing *Actinobacteria* (Mycolota) in activated sludge foams. *FEMS Microbiology Ecology* **61**: 174-184.

- Kragelund, C., Levantsi, C., Borger, A., Thelen, K., Eikelboom, D., Tandoi, V. *et al.* (2008a) Identity, abundance and ecophysiology of filamentous bacteria belonging to *Bacteroidetes* present in activated sludge plants. *Microbiology* **154**: 886-894.
- Kragelund, C., Müller, E., Nielsen, J.L., Daims, H., y Nielsen, P.H. (2008b) Viability and survival of filamentous mycolata in foam. ISME 12, Cairns, Australia.
- Kragelund, C., Müller, E., Schade, M., Nguyen, H.T.T., Lemmer, H., Seviour, R.J., y Nielsen, P.H. (2009) Identification of filamentous bacteria by FISH en *FISH Handbook for Biological Wastewater Treatment*. Nielsen, P.H., Daims, H., y Lemmer, H. (eds). UK: IWA Publishing.
- Kragelund, C., Nilsson, B., Eskilsson, K., Bøgh, A.M., y Nielsen, P.H. (2010) Full-scale control of Mycolata foam by FEX-120 addition. *Water Science and Technology* **61** (10): 2443-2450.
- Kragelund, C., Thomsen, T.R., Mielczarek, A.T., y Nielsen, P.H. (2011) Eikelboom's morphotype 0803 in activated sludge belongs to the genus *Caldilinea* in the phylum *Chloroflexi*. *FEMS Microbiology Ecology* **76**: 451-462.
- Krhutková, O., Ruzickova, I., y Wanner, J. (2002) Microbial evaluation of activated sludge and filamentous population at eight Czech nutrient removal activated sludge plants during year 2000. *Water Science and Technology* **46**(1-2): 471-478.
- Kristensen, G.H., Jørgensen, P.E., y Neilsen, P.H. (1994) Settling characteristics of activated sludge in Danish treatment plants with biological nutrient removal. *Water Science and Technology* **29**(7): 157-165.
- Kruit, J., Boley, F., Jacobs, L.J.A.M., y Wouda, T.W.M. (1994) Prediction of the O₂ conditions in the selector. *Water Science and Technology* **29**(7): 229-237.
- Kruit, J., Hulsbeek, J., y Visser, A. (2002) Bulking sludge solved. *Water Science and Technology* **46**: 457-464.
- Kunst, S., y Reins, M. (1994) Practical investigations in bulking and foaming in activated sludge plants with biological phosphorus removal. *Water Science and Technology* **29**(7): 289-294.

L

- Lackey, J.B. (1938) Protozoan plankton as indicators of pollution in flowing streams. *Public Health Reports* **53**(46): 2037-2058.
- Lacko, N., Bux, F., y Kasan, H.C. (1999) Survey of filamentous bacteria in activated sludge plants in KwaZulu-Natal. *Water SA* **25**: 63-68.
- Lapinski, J., y Tunnacliffe, A. (2003) Reduction of suspended biomass in municipal wastewater using bdelloid rotifers. *Water Research* **37**: 2027-2034.
- Larkin, J.M. (1989) Genus II. *Thiothrix* Winogradsky 1888 en *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Staley, J.P., Bryant, M.P., Pfennig, N., y Holt, J.G. (eds). Baltimore: Williams & Wilkins, pp. 2098-2101.

- Larkin, J.M., y Shinabarger, D.L. (1983) Characterization of *Thiothrix nivea*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **33**: 841-846.
- Larsen, P., Nielsen, J.L., Svendsen, T.C., y Nielsen, P.H. (2008) Adhesion characteristics of nitrifying bacteria in activated sludge. *Water Research* **42**: 2814-2826.
- Larsen, P., Eriksen, P.S., Lou, M.A., Thomsen, T.R., Kong, Y.H., Nielsen, J.L., y Nielsen, P.H. (2006) Floc-forming properties of polyphosphate accumulating organisms in activated sludge. *Water Science and Technology* **54**(1): 257-265.
- Lau, A.O., Strom, P.F., y Jenkins, D. (1984) The competitive growth of floc-forming and filamentous bacteria: a model for activated sludge bulking. *Journal Water Pollution Control Federation* **56**(1): 52-61 .
- Lavender, P., Cowley, E., y Horan, N.J. (2003) Experiences with activated sludge bulking in UK en *Conference Proceedings Poster Papers of the Ninth IWA Specialised Conference on Design, Operation and Economics of Large Wastewater Treatment Plants*. Praha, Czech Republic, pp. 171-174.
- Leal, A.L., Dalzochio, M.S., Flores, T.S., de Alves A.S., Macedo, J.C., y Valiati, V.H. (2013) Implementation of the sludge biotic index in a petrochemical WWTP in Brazil: improving operational control with traditional methods. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **40**(12): 1415-1422.
- Lechevalier, M.P., y Lechevalier, H.A. (1974) *Nocardia amarae* sp. nov., an actinomycete common in foaming activated sludge. *International Journal of Systematic Bacteriology* **24**: 278-288.
- Lechevalier, H. (1975) Actinomycetes of sewage treatment plants en U.S. *Dept. of Commerce National Technical Information Service Report*.
- Lee, N., Nielsen, P.H., Andreasen, K.H., Juretschko, S., Nielsen, J.L., Schleifer, K.H., y Wagner, M. (1999) Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography – a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 1289-1297.
- Lee, J.J., Leedale, G.F., y Bradbury, P. (2000) *An Illustrated Guide to the Protozoa* (ed. Society of Protozoologists), vol. I y II, Lawrence, Kansas.
- Lee, N.M., y Welander, T. (1996) Reducing sludge production in aerobic wastewater treatment through manipulation of the ecosystem. *Water Research* **30**: 1781-1790.
- Lee, S., Basu, S., Tyler, C.W., y Wei, I.W. (2004) Ciliate populations as bio-indicators at Deer Island treatment plant. *Advances in Environmental Research* **8**: 371-378.
- Lee, Y., y Oleszkiewicz, J.A. (2003) Effects of predation and ORP conditions on the performance of nitrifiers in activated sludge systems. *Water Research* **37**: 4202-4210.
- Legendre, P., y Legendre, L. (1998) *Numerical Ecology*. Amsterdam: El sevier Science BV, 853 pp.
- Legendre, P., y Anderson, M.J. (1999) Distance-based redundancy analysis: testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. *Ecological Monographs* **69**: 1-24.

- Lemmer, H., y Popp, W. (1982) Mikrobiologische Ursachen von Schwimmschlamm in Belebungsanlagen. *Korrespondenz Abwasser* **29**: 808-811.
- Lemmer, H., y Kroppenstedt, R.M. (1984) Chemotaxonomy and physiology of some Actinomycetes isolated from scumming activated sludge. *Systematic and Applied Microbiology* **5**: 124-135.
- Lemmer, H. (1986) The ecology of scum causing Actinomycetes in sewage treatment plants. *Water Research* **20**: 531-535.
- Lemmer, H., y Baumann, M. (1988a) Scum actinomycetes in sewage treatment plants – part 2: the effect of hydrophobic substrate. *Water Research* **22**: 761-763.
- Lemmer, H., y Baumann, M. (1988b) Scum actinomycetes in sewage treatment plants – part 3: synergisms with other sludge bacteria. *Water Research* **22**: 765-767.
- Lemmer, H., Lind, G., Müller, E., y Schade, M. (2005) Non-famous scum bacteria: biological characterization and troubleshooting. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* **33**: 197-202.
- Levantesi, C., Beimfohr, C., Geurkink, B., Rossetti, S., Thelen, K., Krooneman, J. *et al.* (2004) Filamentous *Alphaproteobacteria* associated with bulking in industrial wastewater treatment plants. *Systematic and Applied Microbiology* **27**: 716-727.
- Levantesi, C., Rossetti, S., Thelen, K., Kragelund, C., Krooneman, J., Eikelboom, D. *et al.* (2006b) Phylogeny, physiology and distribution of ‘*Candidatus Microthrix calida*’, a new *Microthrix* species isolated from industrial activated sludge wastewater treatment plants. *Environmental Microbiology* **8**: 1552-1563.
- Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich III, R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljanski, G., Sprague, V., Vavra, J., y Wallace, F.G. (1980) A newly revised classification of the Protozoa. *Journal of Protozoology* **27**: 37-58.
- Lishman, L.A., Legge, R.L., y Farquhar, G. (2000) Temperature effects on wastewater treatment under aerobic and anoxic conditions. *Water Research* **34**: 2263-2276.
- Liu, J.R., Burrell, P., Seviour, E.M., Soddell, J.A., Blackall, L.L., y Seviour, R.J. (2000) The filamentous bacterial morphotype ‘*Nostocoida limicola*’ I contains at least two previously described genera in the low G+C gram positive bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **23**: 528-534.
- Liu, J.R., y Seviour, R.J. (2001) Design and application of oligonucleotide probes for fluorescent *in situ* identification of the filamentous bacterial morphotype *Nostocoida limicola* in activated sludge. *Environmental Microbiology* **3**: 551-560.
- Liu, J.R., McKenzie, C.A., Seviour, E.M., Webb, R.I., Blackall, L.L., Saint, C.P., y Seviour, R.J. (2001) Phylogeny of the filamentous bacterium ‘*Nostocoida limicola*’ III from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 195-202.

- Liu, J.-R., Tanner, R.S., Schumann, P., Weiss, N., McKenzie, C.A., Janssen, P.H. *et al.* (2002) Emended description of the genus *Trichococcus*, description of *Trichococcus collinsii* sp nov., and reclassification of *Lactosphaera pasteurii* as *Trichococcus pasteurii* com. nov. and of *Ruminococcus palustris* as *Trichococcus palustris* comb. nov. in the low-G+C Gram positive bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 1113-1126.
- Liu, J., Yang, M., Qi, R., An, W., y Zhou, J. (2008) Comparative study of protozoan communities in full-scale MWTPs in Beijing related to treatment process. *Water Research* **48**: 1907-1908.
- Liu, J., Yang, M., Qi, R., y Xu, M. (2009) Study on protozoan community structures during activated sludge bulking. *Chinese Journal of Environmental Engineering*: 2009-02.
- Loy, A., Daims, H., y Wagner, M. (2002) Activated sludge – molecular techniques for determining community composition en *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. Bitton, G. (ed.). New York: John Wiley and Sons, Inc., pp. 26-43.
- Lu, H., Chandran, K., y Stensel, D. (2014) Microbial ecology of denitrification in biological wastewater treatment. *Water Research* **64**: 237-254.
- Lu, H., Kalyuzhnaya, M., y Chandran, K. (2012) Comparative proteomic analysis reveals insights into anoxic growth of *Methyloversatilis universalis* FAM5 on methanol and ethanol. *Environmental Microbiology* **14**(11): 2935-2945.
- Luna-Pabello, V.M., Mayén, R., Olvera-Viascan, V., Saavedra, J., y Durán de Bazúa, C. (1990) Ciliated protozoa as indicators of a wastewater treatment system performance. *Biological Wastes* **32**(2): 81-90.
- Luxmy, B.S., Nakajima, F., y Yamamoto, K. (2000) Predator grazing effect on bacterial size distribution and floc size variation in membrane-separation activated sludge. *Water Science and Technology* **42**(3-4): 211-217.

M

- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., y Clark, D.P. (2009) Brock Biología de los microorganismos. 12ª ed. Madrid: Pearson Addison Wesley.
- Madoni, P. y Ghetti, P.F. (1981) The structure of ciliated protozoa communities in biological sewage treatment plants. *Hydrobiologia* **83**: 207-215.
- Madoni, P., y Antonietti, R. (1984) Colonization dynamics of ciliated protozoa populations in an activated sludge plant en *4º Simposio Dinamica Popolazioni*. Parma, pp. 105-112.
- Madoni, P. (1984) Estimation of the size of freshwater ciliate populations by a sub-sampling technique. *Hydrobiologia* **111**(3): 201-206.
- Madoni, P. (1986) Protozoa in waste treatment systems en *Perspectives in Microbial Ecology*. Megusar, F., y Gantar, M. (eds). Ljubljana: Slovene Society of Microbiologist, pp. 86-90.
- Madoni, P. (1988) I protozoi ciliate nel controllo di efficienza dei fanghi attivi. Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale, Reggio Emilia.

- Madoni, P. (1991) Role of Protozoans and their indicator value in the activated sludge process en *Biological Approach to Sewage: Current Status and Perspectives*. Madoni, P. (ed). Perugia, pp. 21-27.
- Madoni, P., Davoli, D., y Chierici, E. (1993) Comparative analysis of the activated sludge microfauna in several sewage treatment works. *Water Research* **27**: 1485-1491.
- Madoni, P. (1994a) Estimates of ciliated protozoa biomass in activated sludge and biofilm. *Bioresource Technology* **48**: 245-249.
- Madoni, P. (1994b) A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis. *Water Research* **28**: 67-75.
- Madoni, P., Davoli, D., Gorbi, G., y Vescovi, L. (1996) Toxic effect of heavy metals on the activated sludge protozoan community. *Water Research* **30**: 135-141.
- Madoni, P., y Davoli, D. (1997) Testing the control of filamentous microorganisms responsible for foaming in a full-scale activated-sludge plant running with initial aerobic or anoxic contact zones. *Bioresource Technology* **60**: 43-49.
- Madoni, P., Davoli, D., y Gibin, G. (2000) Survey of filamentous microroganims from bulking and foaming activated-sludge plants in Italy. *Water Research* **34**: 1767-1772.
- Madoni, P. (2002) Protozoa in activated sludge en *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. Bitton, G. (ed.). New York: John Wiley and Sons, Inc., pp. 2605-2612.
- Madoni, P. (2011) Protozoa in wastewater treatment processes: a minireview. *Italian Journal of Zoology* **78**(1): 3-11.
- Mallory, L.M., Yuk, C.S., Liang, L.N., y Alexander, M. (1983) Alternative prey: a mechanism for elimination of bacterial species by protozoa. *Applied and Environmental Microbiology* **46**: 1073-1079.
- Manz, W., Eisenbrecher, M., Neu, T.R., y Szewzyk U. (1998). Abundance and spatial organization of gram-negative sulfate-reducing bacteria in activated sludge investigated by in situ probing with specific 16S rRNA targeted oligonucleotides. *FEMS Microbiology Ecology* **25**: 43-61.
- Margulis, L., Corliss, J.O., Melkonian, M., y Chapman, D.J. (1990) *Handbook of Protoctista : the structure, cultivation, habitats y life histories of the eukaryotic microorganisms and their descendants exclusive of animals, plants and fungi: a guide to the algae, ciliates, foraminifera, sporozoa, water molds, slime, molds and the other protoctists*. Jones y Barlett Pub (ed). Boston.
- Marsh, T.L, Liu, W.-T., Forney, L.J., y Cheng, H. (1998) Beggining a molecular analysis of the eukaryal mediated quenching in oligonucleotide probes. *Nucleics Acids Research* **37**(4-5): 455-460.
- Martín-Cereceda, M., Serrano, S. y Guinea, A. (1995) Occurrence of *Acineria uncinata* in activated sludge plants: morphology and relationship with physico-chemical parameters. *Archiv für Protistenkunde* **146**: 79-84.
- Martín-Cereceda, M., Serrano, S., y Guinea, A. (1996) A comparative study of ciliated protozoa communities in activated sludge plants. *FEMS Microbiology Ecology* **21**: 267-276.

- Martín, M. (2005). *Técnicas e Instrumentos de Gestión Ambiental*. Editorial Nau Llibres.
- Martín-González, A., Díaz, S., Borniquel, S., Gallego, A., y Gutiérrez, J.C. (2005) Cytotoxicity and bioaccumulation of heavy metals by ciliated protozoa isolated from urban wastewater treatment plants. *Research in Microbiology* **157**(2): 108-118.
- Martins, A.M.P., Pagilla, K., Heijnen, J.J., y van Loosdrecht, M.C.M. (2004) Filamentous bulking sludge – a critical review. *Water Research* **38**: 793-817.
- Maszenan, A.M., Seviour, R.J., Patel, B.K.C., Schumann, P., Burghardt, J., Tokiwa, Y., y Stratton, H.M. (2000) Three isolates of novel polyphosphate-accumulating Gram-positive cocci, obtained from activated sludge, belong to a new genus, *Tetrasphaera* gen. nov., and description of two new species, *Tetrasphaera japonica* sp. nov. and *Tetrasphaera australiensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 593-603.
- Maza-Márquez P., Gómez-Silván, C., Gómez, M.A., González-López, J., Martínez-Toledo, M.V., y Rodelas, B. (2015) Linking operation parameters and environmental variables to population dynamics of Mycolata in a membrane bioreactor. *Bioresource Technology* **180**: 318-329.
- McArdle, B.H., y Anderson, M.J. (2001) Fitting multivariate models to community data: a comment on distance-based redundancy analysis. *Ecology* **82**: 290-297.
- McCambridge, J., y McMeekin, T.A. (1980) Relative effects of bacterial and protozoan predators on survival of *Escherichia coli* in estuarine water samples. *Applied and Environmental Microbiology* **40**(5): 907-911.
- McIlroy, S.J., Karst, S.M., Nierychlo, M., Dueholm, M.S., Albertsen, M., Kirkegaard, R.H., Seviour, R.J., y Nielsen, P.H. (2016) Genomic and *in situ* investigations of the novel uncultured *Chloroflexi* associated with 0092 morphotype filamentous bulking in activated sludge. *The ISME Journal* **10**: 2223-2234.
- McKenzie, C.M., Seviour, E.M., Schumann, P., Maszenan, A.M., Liu, J.R., Webb, R.I. *et al.* (2006) Isolates of ‘*Candidatus Nostocoida limicola*’ Blackall *et al.* 2000 should be described as three novel species of the genus *Tetrasphaera*, as *Tetrasphaera jenkinsii* sp. nov., *Tetrasphaera vanveenii* sp. nov. and *Tetrasphaera veronensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**: 2279-2290.
- Meier, H., Amann, R., Ludwig, W., y Schleifer, K.H. (1999) Specific oligonucleotide probes for *in situ* detection of a major group of Gram-positive bacteria with low DNA G+C content. *Systematic and Applied Microbiology* **22**: 186-196.
- Mielczarek, A.T., Kragelund, C., Eriksen, P.S., y Nielsen, P.H. (2012). Population dynamics of filamentous bacteria in Danish wastewater treatment plants with nutrient removal. *Water Research* **46**: 3181-3795.
- Mikkelsen, L.H., y Keiding, K. (2002) Physico-chemical characteristics of full-scale sewage sludges with implications to dewatering. *Water Research* **36**: 2451-2462.
- Miłobędzka, A., y Muszyński, A. (2015) Population dynamics of filamentous bacteria identified in Polish full-scale wastewater treatment plants with nutrients removal. *Water Science and Technology* **71**(5): 675-684.

- Milobędzka, A., y Muszyński, A. (2014) Filamentous Bacteria in Polish Full-scale Wastewater Treatment Plants with Nutrients Removal en *Proceedings of the IWA 6th Eastern European Young Water Professionals Conference 'East Meets West'*. Istanbul, pp. 903-912.
- Milobędzka, A., Witeska, A., y Muszyński, A. (2016) Factors affecting population of filamentous bacteria in wastewater treatment plants with nutrients removal. *Water Science and Technology* **73**(4): 790-797.
- Mino, T. (1995) Survey on filamentous microorganisms in activated-sludge processes in Bangkok, Thailand. *Water Science and Technology* **31**(9): 193-202.
- Mino, T. (1999) Bulking, foaming problems in Japan. Internal document, Department of Environmental and Urban Engineering, The University of Tokyo.
- Mohr, J.L. (1952) Protozoa as indicators of pollution. *The Scientific Monthly* **74**: 7-9.
- Montoya, T., Zornoza, A., Granell, P., Fayos, G., Fajardo, V., Zorrilla, F., Alonso, J.L., Morenilla, J.J., Bernácer, I., y Martínez, F.J. (2009) Empleo de la viabilidad celular como herramienta para el control de la dosificación de cloro sobre un fango activado con problemas de *bulking*. *Tecnología del Agua* **312**: 24-32.
- Mori, T., Itokazu, K., Ishikura, Y., Mishina, F., Sakai, Y., y Koga, M. (1992) Evaluations of control strategies for Actinomycete scum in full-scale treatment plants. *Water Science and Technology* **25**(6): 231-237.
- Morishita, I. (1970) Studies on protozoa populations in activated sludge of sewage and waste treatment plants. *Japanese Journal of Protozoology* **3**: 1-13.
- Morishita, I. (1976) Protozoa in sewage and wastewater treatment systems. *Transactions of the American Microscopic Society* **95**: 373-377.
- Mujeriego, R. (1990) *Riego con Agua Residual Municipal Regenerada*. Mujeriego, R. (ed.). Universitat Politècnica de Catalunya. Diputació de Barcelona, 145 pp.
- Mulder, E.G., Antheunisse, J., y Crombach, W.H.J. (1971) Microbial aspects of pollution in the food and dairy industries en *Microbial Aspects of Pollution*. Sykes, G., y Skinner, F. A. (eds). London: Academic Press, pp. 71-89
- Mulder, A., Vandegraaf, A.A., Robertson, L.A., y Kuenen, J.G. (1995) Anerobic amoniuom oxidation discovered in a denitrifying fluidized-bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology* **16**: 177-183.
- Müller, E., Schade, M., y Lemmer, H. (2005) Filaments in scum: detection and identification quality of classical microscopic sludge analysis vs. fluorescence *in situ* hybridization en *Proc. 4th Activated Sludge*.
- Müller, E., Schade, M., y Lemmer, H. (2007) Filamentous scum bacteria in activated sludge plants: detection and identification quality by conventional activated sludge microscopy versus fluorescence *in situ* hybridization. *Water Environment Research* **79**(11): 2274-2286.

N

- Neef, A., Witzemberger, R., y Kämpfer, P. (1999) Detection of sphingomonads and *in situ* identification in activated sludge using 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **23**: 261-267.
- Nicolau, A., Dias, N., Mota, M., y Lima, N. (2001) Trends in the use of protozoa in the assessment of wastewater treatment. *Research in Microbiology* **152**: 621-630.
- Nicolau, A., Martins, M.J., Mota, M., y Lima, N. (2005) Effect of copper on the protistan community of activated sludge. *Chemosphere* **58**: 605-614.
- Nicolau, A., Mota, M., y Lima, N. (2007) Microfauna as indicator of copper, zinc and cyclohexamide in activated sludge processes. *Environmental Engineering Science* **24**: 434-445.
- Nielsen, J.L., Mikkelsen, L.H., y Nielsen, P.H. (2001) *In situ* detection of cell surface hydrophobicity of probe-defined bacteria in activated sludge. *Water Science and Technology* **43**(6): 97-103.
- Nielsen, J.L., y Nielsen, P.H. (2002) Enumeration of acetate-consuming bacteria by microautoradiography under oxygen and nitrate respiring conditions in activated sludge. *Water Research* **36**: 421-428.
- Nielsen, J.L., Aquino de Muro, M., y Nielsen, P.H. (2003a) Determination of viability of filamentous bacteria in activated sludge by simultaneous use of MAR, FISH and reduction of CTC. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 641-643.
- Nielsen, J.L., Christensen, D., Kloppenborg, M., y Nielsen, P.H. (2003b) Quantification of cell-specific substrate uptake by probe-defined bacteria under *in situ* conditions by microautoradiography and fluorescence *in situ* hybridization. *Environmental Microbiology* **5**: 202-211.
- Nielsen, P.H., Roslev, P., Dueholm, T.E., y Nielsen, J.L. (2002) *Microthrix parvicella*, a specialized lipid consumer in anaerobic-aerobic activated sludge plants. *Water Science and Technology* **46**: 73-80.
- Nielsen, P.H., Kragelund, C., Nielsen, J.L., Tiro, S., Lebek, M., Rosenwinkel, K.H., y Gessesse, A. (2005) Control of *Microthrix parvicella* in activated sludge plants by dosage of polyaluminium salts: possible mechanisms. *Acta Hydroquímica et Hydrobiológica* **33**: 255-261.
- Nielsen, P.H., Kragelund, C., Seviour, R.J., y Nielsen, J.L. (2009a) Identity and ecophysiology of filamentous bacteria in activated sludge. *FEMS Microbiology Reviews* **33**(6): 969-998.
- Nielsen, P.H., Daims, H., y Lemmer, H. (eds) (2009b) *FISH Handbook for Biological Wastewater Treatment*. London: IWA Publishing.
- Nisbet, B. (1984) *Nutrition and Feeding Strategies in Protozoa*. London: Croom Helm, 280 pp.
- Noutsopoulos, C., Mamais, D., y Andreadakis, A. (2006) Effect of solids retention time on *Microthrix parvicella* growth. *Water S.A* **32**(3): 315-321.

O

- Obaja, D., Mace, S., y Mata-Alvarez, J. (2005) Biological nutrient removal by a sequencing batch reactor (SBR) using an internal organic carbon source in digested piggery wastewater. *Bioresource Technology* **96**: 7-14.
- Ogden, C.G., y Hedley., R.H. (1980) *An Atlas of Freshwater Testae Amoebae*. British Museum (Natural History). Oxford: University Press.
- Olson, T.C., y Hooper, A.B. (1983) Energy coupling in the bacterial oxidation of small molecules: an extracytoplasmic dehydrogenase in *Nitrosomonas*. *FEMS Microbiology Letters* **19**: 47-50.

P

- Page, F.C. (1988) *A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae*. Ambleside, UK: CCAP, FBA.
- Pagilla, K., Jenkins, D., y Kido, W. (1996) *Nocardia* control in activated sludge by classifying selectors. *Water Environment Research* **68**: 235-239.
- Papadimitriou, C., Palaska, G., Samaras, P., Lazaridou, M., y Sakellariopoulos, G.P. (2004) The relation of protozoan populations to activated sludge performance en *Protection and Restoration of the Environment VII - Mykonos*.
- Papadimitriou, C., Palaska, G., Lazaridou, M., Samaras, P., y Sakellariopoulos, G.P. (2007) The effects of toxic substances on the activate sludge microfauna. *Desalination* **211**: 177-191.
- Papadimitriou, C.A, Petridis, D., Zouboulis, A.I., Samaras, P., Yiangou, M., y Sakellariopoulos, G.P. (2013) Protozoans as indicators of sequential batch processes for phenol treatment; an autoecological approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **98**: 210-218.
- Parada-Albarracín, J.A., Marin, E., Pérez, J.I., Moreno, B., y Gómez, M.A. (2012) Evolution of filamentous bacteria during urban wastewater treatment by MBR. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* **47**(6): 863-872.
- Parody, D.F. (1997) Microorganismos filamentosos en *Microorganismos filamentosos en el Fango Activo*. Sevilla: EMASESA y Ayuntamientos de Sevilla, pp. 23-95.
- Pasveer, A. (1969) A case of filamentous activated sludge. *Journal of the Water Pollution Control Federation* **41**: 1340-1352.
- Pauli, W., Jax, K., y Berger, S. (2001). Protozoa in Wastewater Treatment: Function and Importance en *The Handbook of Environmental Chemistry. Vol 2K: Biodegradation and Persistence*. Beek, B. (ed.). Berlin: Springer, pp: 203-252.
- Pellegrin, V., Juretschko, S., Cottenceau, G., y Wagner, M. (1999) Morphological and biochemical properties of a *Sphaerotilus* sp. Isolated from paper mill slimes. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(1): 156-162.

- Pérez-Uz, B., Arregui, L., Salvadó, H., Zornoza, A., y Rodríguez, E., Fernández, N., Calvo, P., y Serrano, S. (2007) Estructura de las comunidades de ciliados en la zona de nitrificación en depuradoras con sistemas avanzados de eliminación de nitrógeno en *XXI Congreso Nacional de Microbiología*. Sevilla: Grupo de Bioindicación de Sevilla.
- Pérez-Uz, B., Serrano, S., Arregui, L., Calvo, P., y Guinea, A. (2008) Protozoos. Identificación de Protistas en EDAR en *Manual Práctico para el Estudio de Grupos Bioindicadores en Fangos Activos*. Madrid: Reed Bussisness Information-Tecnología del Agua, pp. 42-53.
- Pérez-Uz, B., Arregui, L., Calvo, P., Salvadó, H., Fernández, N., Rodríguez, E., Zornoza, A., y Serrano, S. (2009) Efficiency of nitrogen removal and protist communities: the potential for introduction of novel biological index en *Proceedings of the International Workshop on Integrated Vision of Urban and Agro-industrial Wastewater Treatment, Monitoring and Reclamation: Key Role Played by the Waste Water Treatment Plant*. ISRIM/LIFE, pp. 1-9.
- Pérez-Uz, B., Arregui, L., Calvo, P., Salvadó, H., Fernández, N., Rodríguez, E., Zornoza, A., y Serrano, S. (2010) Assesment of advanced wastewater treatments for nitrogen removal searching for plausible efficiency bioindicators. *Water Research* **44**: 5059-5069.
- Pernelle, J.J., Gaval, G., Cotteux, E., y Duchene, P. (2001) Influence of transient substrate overloads on the proliferation of filamentous bacterial populations in an activated sludge pilot plant. *Water Research* **35**(1): 129-134.
- Petropoulos, P., y Gilbride, K.A. (2005) Nitrification in activated sludge batch reactors is linked to protozoan grazing of the bacterial population. *Canadian Journal of Microbiology* **51**: 791-799.
- Pillai, S.C., y Subrahmanyam, V. (1942) The role of the protozoa in the activated sludge process. *Nature* **150**: 525.
- Pipes, W.O. (1967) Bulking of activated sludge. *Advances in Applied Microbiology* **9**: 185-234.
- Pipes, W.O. (1978) Actinomycete scum production in activated sludge processes. *Journal of the Water Pollution Control Federation* **Abril**: 628-634.
- Pitt, P., y Jenkins, D. (1990) Causes and control of *Nocardia* in activated sludge. *Journal of the Water Pollution Control Federation* **62**: 143-150.
- Pogue, A.J., y Gilbride, K.A. (2007) Impact of protozoan grazing on nitrification and the ammonia and nitrite oxidizing bacterial communities in activated sludge. *Canadian Journal of Microbiology* **53**: 559-571.
- Poole J.E.P. y Fry, J.C. (1980) A study of the protozoan and metazoan populations of three oxidation ditches. *Journal of the Water Pollution Control Federation* **79**: 19-27.
- Poole, J.E.P. (1984) A study of the relationship between the mixed liquor fauna and plant performance for a variety of activated sludge sewage treatment works. *Water Research* **18**: 281-187.
- Pratt, J.R., y Cairns, J. (1985) Functional groups in the protozoa: roles in differing ecosystem. *Journal of Protozoology* **32**(3): 415-423.

- Pretorius, W.A., y Laubscher, C.J.P. (1987) Control of biological scum in activated sludge plants by means of selective flotation. *Water Science and Technology* **19**(5-6): 1003-1011.
- Pudo, J., y Erndt, E. (1981) The influence of nonionic detergents on the organism community in activated sludge. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie* **21**: 1083-1087
- Puigagut, J., Salvadó, H., y García, J. (2005) Short-term harmful effects of ammonia nitrogen on activated sludge microfauna. *Water Research* **39**(18): 4397-4404.
- Puigagut, J., Salvadó, H., Tarrats, X., y García, J. (2007) Effects of particulate and soluble substrates on microfauna populations and treatment efficiency in activated sludge systems. *Water Research* **14**: 3168-3176.
- Puigagut, J., García, J., y Salvadó, H. (2009) Microfauna community as an indicator of effluent quality and operational parameters in an activated sludge system for treating piggery wastewater. *Water, Air, and Soil Pollution* **203**(1-4): 207-216.
- Pujol, R., Duchene, P., Schetrite, S., y Canler, J.P. (1991) Biological foams in activated-sludge plants – characterization and situation. *Water Research* **25**: 1399-1404.
- Pujol, R., y Canler, J.P. (1994) Contact zone – French practice with low F/M bulking control. *Water Science and Technology* **29**(7): 221-228.
- Puytorac, P. de., Grain, J., y Mignot, J.P. (1987) *Précis de Protistologie*. París: Société Nouvelle des Éditions Boubée.

R

- Ramette, A. (2007) Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* **62**: 142-160.
- Ramirez, E., Warren, A., Rivera, F., Bonilla, P., Rodríguez, S., y Calderon, A. (1993) An investigation of the pathogenic and non-pathogenic amoebae in activated sludge plant. *Water, Air and Soil Pollution* **69**: 135-139.
- Ramothokang, T.R., Naidoo, D., y Bux, F. (2006) ‘Morphological shifts’ in filamentous bacteria isolated from activated sludge processes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **22**: 845-850.
- Randall, C.W., Waltrip, D., y Wable, M.V. (1990) Upgrading a municipal activated sludge plant for high-rate biological nutrient removal. *Water Science and Technology* **22**(7-8): 21-33.
- Rao, C.R (1964) The use and interpretation of principal component analysis in applied research. *Sankhya A* **26**: 329-358.
- Rao, J.N.K. (1968) On expectations, variances, and covariances of ANOVA mean squares by ‘synthesis’. *Biometrics* **24**: 963-978.
- Ratsak, C.H., Maarsen, K.A., y Kooijman, S.A.L. (1996) Effects of protozoan on carbon mineralization in activated sludge. *Water Research* **30**: 1-12.
- Ratsak, C.H., y Verkuijlen, J. (2006) Sludge reduction by predatory activity of aquatic oligochaetes in wastewater treatment plants: science or fiction? A review. *Hidrobiologia* **564**: 197-211.

- Reid, R. (1969) Fluctuations in population of three *Vorticella* species from an activated sludge sewage plant. *Journal of Protozoology* **16**(1): 103-111.
- Reuschenbach, P., Pagga, U., y Strotmann, U. (2003) A critical comparison of respirometric biodegradation tests based on OECD 301 and related test methods. *Water Research* **37**: 1571-1582.
- Reyes, M., Borrás, L., Seco, A., y Ferrer, J. (2015) Identification and quantification of microbial populations in activated sludge and anaerobic digestion processes. *Environmental Technology* **36**: 45-53.
- Richard, M.G., Jenkins, D., Hao, O., y Shimizu, G. (1982) The isolation and characterization of filamentous microorganisms from activated sludge bulking en *Sanitary Engineering and Environmental Health Research Laboratory*. Berkeley, University of California.
- Richard, M. (1989) *Activated Sludge Microbiology*. Alexandria, Virginia: The Water Pollution Control Federation.
- Richard, M.G., Hao, O., y Jenkins, D. (1985) Growth kinetics of *Sphaerotilus* species and their significance in activated sludge bulking. *Journal of the Water Pollution Control Federation* **57**: 68-81.
- Rijnaarts, H.H.M., Norde, W., Bouwer, E., Lyklema, J., y Zehnder, A.J.B. (1995) Reversibility and mechanism of bacterial adhesion. *Colloids and Surfaces B* **4**: 5-22.
- Rodríguez, E., Isac, L., Álvarez, M., Zornoza, A., y Fernández, N (2005) Tratamiento y conservación de muestras para análisis microbiológicos de fangos activos. *Tecnología del Agua* **265**: 60-70.
- Rodríguez, E., Isac, L., Salas, L., Fernández, N., Zornoza, A., Pérez-Uz, B., Serrano, S., Arregui, L., Calvo, P., Guinea, A., y Estevez, F. (2008) *Manual Práctico para el Estudio de Grupos Bioindicadores en Fangos Activos*. Madrid: Tecnología del Agua y EMASESA.
- Roels, T., Dauwe, F., Van Damme, S., De Wilde, K., y Roelandt, F. (2002) The influence of PAX-14 on activated sludge systems and in particular on *Microbrix parvicella*. *Water Science and Technology* **46**(1-2): 487-490.
- Romera, V., Zornoza, A., y Alonso, J.L (2013) Identification and abundance of *Thiothrix* in WWTPs en *International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology - BiomicroWorld 2013*. Madrid.
- Ross, R.D., y Ellis, L.M. (1992) Laboratory-scale investigation of foaming in anaerobic digesters. *Water Environment Research* **64**: 154-162.
- Rossetti, S., Carucci, A., y Rolle, E. (1994) Survey on the occurrence of filamentous organisms in municipal wastewater treatment plants related to their operating conditions. *Water Science and Technology* **29**(7): 305-308.
- Rossetti, S., Tomei, M.C., Levantesi, C., Ramadori, R., y Tandoi, V. (2002) “*Microbrix parvicella*”: a new approach for kinetic and physiological characterization. *Water Science and Technology* **46**(1): 65-72.
- Rossetti, S., Blackall, L., Levantesi, C., Uccelletti, D., y Tandoi, V. (2003) Phylogenetic and physiological characterization of a heterotrophic, chemolithoautotrophic *Thiothrix* strain isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 1271-1276.

- Rossetti, S., Tomei, M.C., Nielsen, P.H., y Tandoi, V. (2005) "*Microthrix parvicella*", a filamentous bacterium causing bulking and foaming in activated sludge systems: a review of current knowledge. *FEMS Microbiology Reviews* **29**: 49-64.
- Ruimy, R., Boiron, P., Boivin, V., y Christen, R. (1994) A phylogeny of the genus *Nocardia* deduced from the analysis of small-subunit ribosomal DNA sequences, including transfer of *Nocardia amarae* to the genus *Gordona* as *Gordona amarae* comb. nov. *FEMS Microbiol Letter* **123**: 261-1907.

S

- Salvadó, H., Gonzalez-Palacios, E., y Gracia, M.P. (1988) Estudio de la población de microorganismos en una planta depuradora urbana de fangos activados. *Publicaciones Departamento de Zoología de Barcelona* **14**: 21-29.
- Salvadó, H. (1990) Study of ciliated protozoa in activated sludge wastewater plants. Tesis. Barcelona: Universitat de Barcelona.
- Salvadó, H., y Garcia, M.P. (1993) Determination of organic loading rate of activated sludge plants based on protozoa analysis. *Water Research* **27**: 891-895.
- Salvadó, H. (1994) Effect of mean cellular retention time on ciliated protozoan populations in urban wastewater plants based on a proposed model. *Water Research* **28**: 1315-1321.
- Salvadó, H., Garcia, M.P., y Amigo, J.M. (1995) Capability of ciliated protozoa as indicators of effluent quality in activated sludge plants. *Water Research* **29**: 1041-1050.
- Salvadó, H., Mas, M., Menendez, S., y Gracia, M.P. (2001) Effects of shock loads of salt on protozoan communities of activated sludge. *Acta Protozoology* **40**(3): 177-185.
- Salvadó, H., y Canals, O. (2015) Caracterización de la estructura de la comunidad eucariota en distintos procesos de depuración en *Curso Teórico-práctico "El papel de los protistas en los procesos de depuración de aguas residuales"*, VII *European Congress of Protistology*. Sevilla.
- Salviati, S., Marconato, E., y Maio, G. (1991) Osservazioni sui protozoi ciliati nel depuratore di una cartiera: dati preliminari. Biological approach to sewage treatment process: current status and perspectives. Madoni, P. (ed). Perugia, pp. 101-103.
- Samaras, P., Papadimitriou, C.A., Vavoulidou, D., Yiangou, M., y Sakellariopoulos, G.P. (2009) Effect of hexavalent chromium on the activated sludge process and on the sludge protozoan community. *Bioresource Technology* **100**: 38-43.
- Santos, L.A., Neto, M., Ferreira, V., Pereira, M.A., y Nicolau, A. (2011) Characterization of the filamentous bacteria Eikelboom Type 0581 in Portuguese activated-sludge systems. *Environmental Microbiology and Biotechnology Posters*. MicroBiotec'11 - Book of Abstracts. No. PS2: 67, Braga, Portugal, 1-3 December, 224, 2011. ISBN: 978-989-97478-1-4

- Santos, L.A., Ferreira, V., Pereira, M.A., y Nicolau, A. (2014). Relationship between protozoan and metazoan communities and operation and performance parameters in a textile sewage activated sludge system. *European Journal of Protistology* **50**(4): 319-318.
- Santos L.A, Ferreira, V., Neto, M.M., Pereira, M.A., Mota, M., y Nicolau, A. (2015) Study of 16 Portuguese activated sludge systems based on filamentous bacteria populations and their relationships with environmental parameters. *Applied Microbiology and Biotechnology* **99**(12): 5307-5316.
- Sawyer, C.N., McCarty, P.L., y Parkin, G.F. (1994) *Chemistry for Environmental Engineering*, 2° ed. USA: McGraw-Hill Companies.
- Schade, M., Beimfohr, C., y Lemmer, H. (2002) Phylogenetic and physiological characterization of a “*Nostocoida limicola*”-like organism isolated from activated sludge. *Water Science and Technology* **46**(1-2): 91-97.
- Scheff, G., Salcher, O., y Lingens, F. (1984) *Trichococcus flocculiformis* gen. nov. sp. nov. A new gram-positive filamentous bacterium isolated from activated sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology* **19**: 114-119.
- Schiemer, F. (1978) Nematoda en *Ecological Aspects of Used Water Treatment. The Organisms and their Ecology*. C.R. Curds, C.R., y Hawkes, H.A. (eds). London: Academic press, pp. 269-288.
- Schleper, C., Jurgens, G., y Jonscheit, M. (2005) Genomic studies of uncultivated Archaea. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 479-488.
- Schofield, T. (1971) Some biological aspects of the activated sludge plant at Leicester. *Water Pollution Control* **70**: 32-47.
- Schramm, A., de Beer, D., van den Heuvel, J.C., Ottengraf, S., y Amann, R. (1999) Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by in situ hybridization and the use of microsensors. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 3690-3696.
- Schulze, R., Spring, S., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., y Kämpfer, P. (1999) Genotypic diversity of *Acidovorax* strains isolated from activated sludge and description of *Acidovorax deflavii* sp. Nov. *Systematic and Applied Microbiology* **22**: 205-214.
- Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Nakamura, K., Ohashi, A., y Harada, H. (1999) Fluorescence *in situ* hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 1280-1288.
- Sekiguchi, Y., Yamada, T., Hanada, S., Ohashi, A., Harada, H., y Kamagata, Y. (2003) *Anaerolinea thermophila* gen. nov., sp nov and *Caldilinea aerophila* gen. nov., sp nov., novel filamentous thermophiles that represent a previously uncultured lineage of the domain *Bacteria* at the subphylum level. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 1843-1851.

- Serafim, L.S., Lemos, P.C., Levantesi, C., Tandoi, V., Santos, H., y Reis, M.A.M. (2002) Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate-accumulating microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* **51**: 1-18.
- Serrano, S., Arregui, L., Pérez-Uz, B., Calvo, P., y Guinea, A. (2008a) *Guidelines for the Identification of Ciliates in Wastewater Treatment Plants*. London: IWA Publishing.
- Serrano, S., Arregui, L., Calvo, P., Salvadó, H., Zornoza, A., Fernández, N., Rodríguez, E., y Pérez-Uz, B. (2008b) Comunidades de protistas asociados a plantas con eliminación de nitrógeno en *V Jornadas Técnicas de Transferencia de Tecnología sobre Microbiología del Fango Activo*. Sevilla: Grupo de Bioindicación de Sevilla.
- Seviour, E.M., Williams, C.J., Seviour, R.J., Soddell, J.A., y Lindrea, K.C. (1990) A survey of filamentous bacterial populations from foaming activated sludge plants in eastern states of Australia. *Water Research* **24**: 493-498.
- Seviour, E.M., Williams, C., DeGrey, B., Soddell, J.A., Seviour, R.J., y Lindrea, K.C. (1994) Studies on filamentous bacteria from Australian activated-sludge plants. *Water Research* **28**: 2335-2342.
- Seviour, E.M., Blackall, L.L., Christensson, C., Hugenholtz, P., Cunningham, M.A., Bradford, D. *et al.* (1997) The filamentous morphotype Eikelboom Type 1863 is not a single genetic entity. *Journal of Applied Microbiology* **82**: 411-421.
- Seviour, R.J., y Blackall, L.L. (eds) (1999) *The Microbiology of Activated Sludge*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Seviour, R.J., Maszenan, A.M., Soddell, J.A., Tandoi, V., Patel, B.K.C., Kong, Y., y Schumann, P. (2000) Microbiology of the 'G-Bacteria' in activated sludge minireview. *Environmental microbiology* **2**: 581-593.
- Seviour, R.J., Liu, J.R., Seviour, E.M., McKenzie, C.A., Blackall, L.L., y Saint, C.P. (2002) The "Nostocoida limicola" story: resolving the phylogeny of this morphotype responsible for bulking in activated sludge. *Water Science and Technology* **46**(1-2): 105-110.
- Seviour, E.M., Eales, K., Izzard, L., Beer, M., Carr, E.L., y Seviour, R.J. (2006) The in situ physiology of "Nostocoida limicola" II, a filamentous bacterial morphotype in bulking activated sludge, using fluorescence *in situ* hybridization and microautoradiography. *Water Science and Technology* **54**(1): 47-53.
- Seviour, R.J., Kragelund, C., Kong, Y., Eales, K.L., Nielsen, J.L., y Nielsen, P.H. (2008) Ecophysiology of the *Actinobacteria* in activated sludge systems. *Antonie van Leeuwenhoek* **94**: 21-33.
- Seviour R.J., y Nielsen, P.H. (eds) (2010a) Microbial ecology of activated sludge. London: IWA Publishing.
- Seviour R.J., Nielsen, P.H. (2010b) Microbial communities in activated sludge en *Microbial Ecology of Activated Sludge*. Seviour, R.J., y Nielsen, P.H. (eds). London: IWA Publishing, pp. 95-125.
- Seviour, E.M., McIlroy, S., y Seviour, R.J. (2010) Descriptions of activated sludge organisms en *Microbial Ecology of Activated Sludge*. Seviour, R.J., y Nielsen, P.H. (eds). London: IWA Publishing, pp. 453-487.
- Sezgin, M., Jenkins, D., y Parker, D.S. (1978) A unified theory of filamentous activated sludge bulking. *Journal of the Water Pollution Control Federation* **50**: 362-381.

- Sezgin, M., Lechevalier, M.P., y Karr, P.R. (1988) Isolation and identification of actinomycetes present in activated sludge scum. *Water Science and Technology* **20**(11-12): 257-263.
- Schade, M., y Lemmer, H. (2005) Lipase activities in activated sludge and scum-comparison of new and conventional techniques. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* **33**: 210-215.
- Schade, M., y Lemmer, H. (2006) *In situ* enzyme activities of filamentous scum bacteria in municipal activated sludge wastewater treatment plants. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* **34**: 480-490.
- Shao, Y., Starr, M., Kaporis, K., Kim, H., y Jenkins, D. (1997) Polymer addition as a solution to *Nocardia* foaming problems. *Water Environment Research* **69**: 25-27.
- Shen, Y.F., Zhang, Z.S., Gong, X.J., y Gu, M.R. (1990) *Modern Biomonitoring Techniques Using Freshwater Microbiota*. Beijing: China Architecture and Building Press.
- Shenggui, C., Muqi, X., Hong, C., Jiang, Z., Kexin, Z., Jun, X., Xiangping, Y., Yiping, g., Weiyan, L., Jiayi, Z., y Yongyi, S. (2004). The activated-sludge fauna and performance of five sewage treatment plants in Beijing, China. *European Journal of Protistology* **40**: 147-152.
- Show, K.-Y., Mao, T., y Lee, D.-J. (2007) Optimisation of sludge disruption by sonication. *Water Research* **41**: 4741-4747.
- Shuttleworth, K.L., y Unz, R.F. (1991) Influence of metals and metal speciation on the growth of filamentous bacteria. *Water Research* **25**: 1177-1186.
- Shuttleworth, K.L., y Unz, R.F. (1993) Sorption of heavy metals to the filamentous bacterium *Thiothrix* strains A1. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 1274 -1282.
- Simek, K., Vrba, J., Pernthaler, J., Posch, T., Hartman, P., Nedoma, J., y Psenner, R. (1997) Morphological and compositional shifts in an experimental bacterial community influenced by protists with contrasting feeding modes. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 587-595.
- Sladka, A., y Ottova, V. (1973) Filamentous organisms in activated sludge. *Hydrobiologia* **43**: 285-299.
- Sladka, A., y Sladeček, V. (1985) Určovací atlas organismů z čistíren odpadních vod. Výzkumný ústav vodohospodářský, Praha.
- Slijkhuis, H. (1983) *Microthrix parvicella*, a filamentous bacterium isolated from activated sludge: cultivation in a chemically defined medium. *Applied and Environmental Microbiology* **46**: 832-839.
- Slijkhuis, H., van Croenestijn, J.W., y Kylstra, D.J. (1984) *Microthrix parvicella*, a filamentous bacterium from activated sludge: growth on Tween 80 as carbon and energy source. *Journal of general microbiology* **130**: 2035-2042.
- Šmilauer, P., y Lepš, J. (2014) Multivariate analysis of ecological data using Canoco5. Cambridge University Press, 362 pp.
- Smirnov, A.V., y Brown, S. (2004) Guide to the methods of study and identification of soil Gymnamoebae. *Protistology* **3**: 148-190.

- Smolders, G.J.F., van Loosdrecht, M.C.M., y Heijnen J.J. (1995) A metabolic modelo for the biological phosphorous removal process. *Water Science and Technology* **31**(2): 79-93.
- Snaidr, J., Beimfohr, C., Levantesi, C., Rossetti, S., van der Waarde, J., Geurkink, B. *et al.* (2002) Phylogenetic analysis and in situ identification of “*Nostocoida limicola*”-like filamentous bacteria in activated sludge from industrial wastewater treatment plants. *Water Science and Technology* **46**(1-2): 99-104.
- Soddell, J.A., y Seviour, R.J. (1990) A review: microbiology of foaming in activated sludge plants. *Journal of Applied Bacteriology* **69**: 145-176.
- Soddell, J., Knight, G., Strachan, W., y Seviour, R.J. (1992) Nocardioforms not *Nocardia* foams. *Water Science and Technology* **26**(3-4): 455-460.
- Soddell, J.A., y Seviour, R.J. (1994) Incidence and morphological variability of *Nocardia pinensis* in Australian activated sludge plants. *Water Research* **28**: 2343-2351.
- Soddell, J., y Seviour, R.J. (1995) Relationship between temperature and growth of organisms causing *Nocardia* foams in activated sludge plants. *Water Research* **29**: 1555-1558.
- Soddell, J., y Seviour, R.J. (1996) Growth of an activated sludge foam-forming bacterium, *Nocardia pinensis*, on hydrophobic substrates. *Water Science and Technology* **34**(5-6): 113-118.
- Soddell, J.A., y Seviour, R.J. (1998) Numerical taxonomy of *Skermania piniformis* and related isolates from activated sludge. *Journal of Applied Microbiology* **84**: 272-284.
- Soddell, J. (1999) Foaming en *The Microbiology of Activated Sludge*. Seviour, R.J., y Blackall, L. (eds). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 161-201.
- Spagni, A., Lavagnolo, M.C., Scarpa, C., Vendrame, P., Rizzo, A., y Luccarini, L. (2007) Nitrogen removal optimization in a sequencing batch reactor treating sanitary landfill leachate. *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering* **42**: 757-765.
- Speirs, L., Mclroy, S., Petrsvski, S., y Seviour, R.J. (2011) The activated sludge bulking filaments Eikelboom morphotype 0914 is a member of the *Chloroflexi*. *Environmental Microbiology Reports* **3**(2): 159-165.
- Sperl, G.T., y Hoare, D.S. (1971) Denitrification with methanol: a selective enrichment for *Hyphomicrobium* species. *Journal of Bacteriology* **108**(2): 733-736.
- Sponza, D.T. (2003) Investigation of extracellular polymer substances (EPS) and physicochemical properties of different activated sludges flocs under steady-state conditions. *Enzyme and Microbial Technology* **32**: 375-385.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A., y Ward-Rainey, N. L. (1997) Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**: 479-491.
- Stratton, H., Seviour B., y Brooks, P. (1998) Activated sludge foaming: What causes hydrophobicity and can it be manipulated to control foaming?. *Water Science and Technology* **37**(4-5): 503-509.

- Stratton, H.M., Brooks, P.R., Griffiths, P.C., y Seviour, R.J. (2002) Cell surface hydrophobicity and mycolic acid composition of *Rhodococcus* strains isolated from activated sludge foams. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **28**: 264-267.
- Stratton, H., Seviour, R.J., y Brooks, P. (1997) Activated sludge foaming: what causes hydrophobicity and can it be manipulated to control foaming? en *Second International Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes*. Jenkins, D., y Hermanowicz, S.W. (eds). Berkeley, CA: IAWQ, pp. 293-300.
- Strom, P., y Jenkins, D. (1984) Identification and significance of filamentous microorganisms in activated sludge. *Journal of the Water Pollution Control Federation* **56**: 449-459.
- Sudo, R., y Aiba, S. (1971) Growth rate of Vorticellidae isolated from activated sludge. *Japanese Journal of Ecology* **21** (2): 70-76.
- Sutherland, L.W. (2001) Exopolysaccharides in biofilms, flocs and related structures. *Water Science and Technology* **43**: 77-86.
- Switzenbaum, M.S., Plante, T.R., y Woodworth, B.K (1992) Filamentous bulking in Massachusetts: extent of the problem and case studies. *Water Science and Technology* **25**: 265-271.

T

- Tandoi, V., Caravaglio, N., Di Dio Balsamo, D., Majone, M., y Tomei, M.C. (1994) Isolation and physiological characterisation of *Thiothrix* sp. *Water Science and Technology* **29**(7): 261-270.
- Tandoi, V., Rossetti, S., Blackall, L.L., y Majone, M. (1998) Some physiological properties of an Italian isolate of "*Microthrix parvicella*". *Water Science and Technology* **37**(4-5): 1-8.
- Tandoi, V., Jenkins, D., y Wanner, J. (eds) (2006) *Activated Sludge Separation Problems*. London: IWA Publishing.
- Tchobanoglous, G., Burton, F.L., y Stensel, H.D. (2003) Meltcalf & Eddy, Inc.'s *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, and Reuse*, 4th Edition. New York: McGraw-Hill, Inc., 1819 pp.
- ter Braak, C.J.F. (1985) Correspondence analysis of incidence and abundance data: properties in terms of a unimodal response model. *Biometrics* **41**: 859-873.
- ter Braak, C.J.F. (1986) Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology* **67**: 1167-1179.
- ter Braak, C.J.F., y Šmilauer, P. (2002) CANOCO Reference Manual and Canodraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). Microcomputer Power, Ithaca, New York.
- ter Braak, C.J.F. (1987). The analysis of vegetation-environment relationships by canonical correspondence analysis. *Vegetatio* **69**(1): 69-77.
- ter Braak, C.J.F., y Prentice, I.C. (1988) A theory of gradient analysis. *Advances in Ecological Research* **18**: 271-313.

- ter Braack, C.J.F. (1988). Partial canonical correspondence analysis en *Classification Methods and Related Methods of Data analysis*. Bock, H.H. (ed). Amsterdam, pp. 551-558.
- Terashi, M., y Hamada, S. (1991) Changes in microfauna at the time of occurrence and disappearance of filamentous bulking. *Water Science and Technology* **23**(4-6): 907-916.
- Tezuka, Y. (1990) Bacterial regeneration of ammonium and phosphorus ratio of organic substrates. *Microbial Ecology* **29**: 227-238.
- Thomsen, T.R., Kjellerup, B.V., Nielsen, J.L., Hugenholtz, P., y Nielsen, P.H. (2002) *In situ* studies of the phylogeny and physiology of filamentous bacteria with attached growth. *Environmental Microbiology* **4**: 383-391.
- Thomsen, T.R., Blackall, L.L., de Muro, M.A., Nielsen, J.L., y Nielsen, P.H. (2006a) *Meganema perideroedes* gen. nov., sp. nov., a filamentous alphaproteobacterium from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**: 1865-1868.
- Thomsen, T.R., Kragelund, C., y Nielsen, P.H. (2006b) Identity, abundance and physiology of *Aquaspirillum* related filamentous bacteria in activated sludge. *Water Science and Technology* **54**(1): 237-245.
- Tipping, P.J. (1995) Foaming in activated sludge processes: an operator's overview. *Journal of the Chartered Institution of Water and Environment Management* **9**: 281-289.
- Toman, M., y Rejic, M. (1988) The effects of low concentrations and short-period lack of dissolved-oxygen upon the organisms of the concomitant biocenosis in activated-sludge. *Z. Wasser-Abwasser Forsch* **21**: 189-193.
- Tracy, K.D., y Hong, S.N. (1990) "Upgrading wastewater treatment plants with anaerobic selectors". *Water Science and Technology* **22**(7-8): 35-43.
- Tsai, M.W., Wentzel, M.C., y Ekama, G.A. (2003) The effect of residual ammonia concentration under aerobic conditions on the growth of *Microthrix parvicella* in biological nutrient removal plants. *Water Research* **37**: 3009-3015.
- Tsang, Y.F., Sin, S.N., y Chua, H. (2008) *Nocardia* foaming control in activated sludge process treating domestic wastewater. *Bioresource Technology* **99**: 3381-3388.
- Tyagi, V.K., Subramaniyan, S., Kazmi, A.A., Chopra, A.K. (2008) Microbial community in conventional and extended aeration activated sludge plants in India. *Ecological Indicators* **8**(5): 550-554.

U

- Ullrich, A.H., y Smith, M. W. (1951) The biosorption process of sewage and waste treatment. *Sewage and Industrial wastes*. **23**: 1248-1253.
- Unz, R.F., y Head, I.M. (2005) Genus I *Thiothrix* en *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2b. Brenner, D.J., Krieg, N.R., y Staley, J.T. (eds). Berlin: Springer, pp. 131-142.

Urbain, V., Block, J.C., y Manen, J. (1993) Bioflocculation in activated sludge: an analytic approach. *Water Reserch* **27**: 829-838.

V

van der Waarde, J. J., Geurkink, B., Henssen, M., y Heijnen, G. (1998) Detection of filamentous and nitrifying bacteria in activated sludge with 16s rRNA probes. *Water Science and Technology* **37**(4): 475-479.

van der Waarde, J., Krooneman, J., Geurkink, B., van der Werf, A., Eikelboom, D., Beimfohr, C., Snaidr, J., Levantesi, C., y Tandoi, V. (2002) Molecular monitoring of bulking sludge in industrial wastewater treatment plants. *Water Science and Technology* **46**(1-2): 551-558.

van Veen, W.L. (1973) Bacteriology of activated sludge, in particular the filamentous bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **39**: 189205.

Vangnai, S., y Klein, D. (1974) A study of nitrite-dependent dissimilatory micro-organisms isolated from Oregon soils. *Soil, Biology and Biochemistry* **6**: 335-339.

Vedry, B. (1987) *L'analyse ecologique des boues activées*. Bruker, C. (ed). SEGTEC, Vicq., 120 pp.

Verhagen, F.J.M., y Laanbroek, H.G. (1991) Competition for ammonium between nitrifying and heterotrophic bacteria in dual energy-limited chemostats. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 3255-3263.

Verhaugen, F.J.M., y Laanbroek, H.J. (1992) Effects of grazing by flagellates on competition for ammonium between nitrifying and heterotrophic bacteria in chemostats. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 1962-1969.

W

Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H., y Schleifer, K.H. (1993) Probing activated sludge with oligonucleotides specific for Proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 1520-1525.

Wagner, M., Amann, R., Kampfer, P., Assmus, B., Hartmann, A., Hutzler, P., Springer, N., y Schleifer, K-H. (1994) Identification and *in-situ* detection of gram-negative filamentous bacteria in activated-sludge. *Systematic and Applied Microbiology* **17**: 405-417.

Wanner, J. (1994a) Activated sludge populations-dynamics. *Water Science and Technology* **30**(11): 159-169.

Wanner, J. (1994b) *Activated Sludge Bulking and Foaming Control*. Lancaster: Technomic Publishing Co., Inc.

Wanner J. (2002) Control of Filamentous Bulking in Activated Sludge en *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, vol. 3. Bitton, G. (ed.). New York, USA: John Wiley and Sons, Inc., pp. 1306-1315.

Wanner, J., Kucman, K., Ottova, V., y Grau, P. (1987a) Effect of anaerobic conditions on activated sludge filamentous bulking in laboratory systems. *Water Research* **21**: 1541-1546.

- Wanner, J., Chudoba, J., Kucman, K., y Proske, L. (1987b) Control of activated sludge filamentous bulking and effect of anoxic conditions. *Water Research* **21**: 1447-1451.
- Wanner, J., y Grau, P. (1989) Identification of filamentous microorganisms from activated sludge: A compromise between wishes, needs and possibilities. *Water Research* **23**: 883-891.
- Wanner, J., Kos, M. y Grau, P. (1990) An innovative technology for upgrading nutrient removal activated sludge plants". *Water Science and Technology* **22**(7-8): 9-20.
- Wanner, J., Ruzickova, I., Jetmarova, P., Krhutkova, O., y Paraniakova, J. (1998b) A national survey of activated sludge separation problems in the Czech Republic: filaments, floc characteristics and activated sludge metabolic properties. *Water Science and Technology* **37**(4-5): 271-279.
- Wanner, J., Ruzickova, I., Krhutkova, O., y Pribyl, M. (2000) Activated sludge population dynamics and wastewater treatment plant design and operation. *Water Science and Technology* **41**: 217-225.
- Wanner, J. (2006) Aeration tank and secondary clarifier as one system en *Activated Sludge Separation Problems – Theory, Control Measures, Practical Experience*. Tandoi, V., Jenkins, D., y Wanner, J. (eds). London: IWA Publishing, pp. 47-61.
- Wanner, J., Kragelund, C., y Nielsen, P.H. (2010). Microbiology of bulking en *The Microbial Ecology of Activated Sludge*. Seviour, R.J., y Nielsen, P.H. (eds). London: IWA Publishing, pp. 200-214.
- Warren, A., Salvadó, H., Curds, C. R., Roberts, D.M. (2010). Foaming en *The Microbial Ecology of Activated Sludge*. Seviour, R.J., y Nielsen, P.H. (eds). London: IWA Publishing, pp. 127-138.
- Wang, P., Yu, Z., Zhao, J., y Zhang, H. (2015) Seasonal changes in bacterial communities cause foaming in a wastewater treatment plant. *Microbial Ecology* **71**(3): 660-671.
- Water Environment Research Foundation [WERF]. (2003) *Treatment Processes and Systems: Methods for Wastewater Characterization in Activated Sludge Modeling*. Publication Number 99WWF3, published by IWA and WEF.
- Weber, S.D., Ludwig, W., Schleifer, K.H. y Fried, J. (2007) Microbial composition and structure of aerobic granular sewage biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 6233-6240.
- WEF (1992) Secondary Clarification en *Design of Municipal Wastewater Treatment Plants, WEF Manual of Practice*, No.8. Alexandria, VA, pp. 582-615.
- Whittaker, R.H. (1967) Gradient analysis of vegetation. *Biological Reviews* **42**(2): 207-264.
- Wilén, B., Lumley, D., Mattsson, A., y Mino, T. (2008) Relationship between floc composition and flocculation and settling properties studied at a full scale activated sludge plant. *Water Research* **42**: 4404-4418.
- Williams, T.M., y Unz, R.F. (1985a) Filamentous sulfur bacteria of activated sludge: characterization of *Thiothrix*, *Beggiatoa*, and Eikelboom Type 021N strains. *Applied and Environmental Microbiology* **49**: 887-898.
- Williams, T.M., y Unz, R.F. (1985b) Isolation and characterization of filamentous bacteria present in bulking activated sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology* **22**: 273-282.

- Williams, T.M., Unz, R.F., y Doman, J.T. (1987) Ultrastructure of *Thiothrix* spp. and type 021N bacteria. *Applied and Environmental microbiology* **53**: 1560-1570.
- Williams, T.M., y Unz, R.F. (1989) The nutrition of *Thiothrix*, Type 021N, *Beggiatoa* and *Leucothrix* strains. *Water Research* **23**: 15-22.
- Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* **51**: 221-271
- Wooms, M., y Laybourn-Parry, J. (1986) The role of nematodes in low rate percolating filter sewage treatment works. *Water Research* **20**: 781-787.
- Wooms, M., y Laybourn-Parry, J. (1987) Seasonal species composition, density and role of nematodes in activated sludge effluent treatment works. *Water Research* **21**: 459-467.

Y

- Yamada, T., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Imachi, H., Ohashi, A., Harada, H., y Kamagata, Y. (2006) *Anaerolinea thermolimosa* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes *Anaerolineae classis* nov. and *Caldilineae classis* nov. in the bacterial phylum *Chloroflexi*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**: 1331-1340.

Z

- Zhou, K., Xu, M., Dai, J., y Cao, H. (2006) The microfauna communities and operational monitoring of an activated sludge plant in China. *European Journal of Protistology* **42**: 291-295.
- Zhou, K., Xu, M., Liu, B., y Cao, H. (2008) Characteristics of microfauna and their relationships with the performance of an activated sludge plant in China. *Journal of Environmental Sciences* **20**: 482-486.
- Zita, A. y Hermansson, M. (1994). Effects of ionic strength on bacterial adhesion and stability of flocs in a wastewater activated sludge system. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 3041-3048.
- Zita, A., y Hermansson, M. (1997a) Determination of bacterial cell surface hydrophobicity of single cells in cultures and in wastewater *in situ*. *FEMS Microbiology Letters* **152**: 299-306.
- Zita, A., y Hermansson, M. (1997b) Effects of bacterial cell surface structures and hydrophobicity on attachment to activated sludge flocs. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 1168-1170.
- Zornoza, A., Rodríguez, E., Isac, L., Alonso, J.L., Fernández, N., Fajardo, V., y Zorrilla, F. (2006) Episodios periódicos de espumación con implicación de filamentos gram negativos. El Morfotipo 0581: un desconocido. *Tecnología del Agua* **275**: 28-40.
- Zornoza, A., Montoya, T., Alonso, J.L., y Tárrega, M.J. (2008) Control del proceso de cloración en un episodio de bulking filamentoso mediante el seguimiento de protozoos ciliados en *Jornada Internacional de Tratamiento y Reutilización en Aguas Residuales. I Congreso Hispano-Francés de Protistología*. Sevilla: Grupo Bioindicación de Sevilla.

- Zornoza, A., Alonso, J.L., Serrano, S., Fajardo, V., Zorrilla, F., Bernácer, I., y Morenilla, J.J. (2010) Estudio integrado del proceso de fangos activos I. Análisis descriptivo de factores físico-químicos y biológicos implicados en su dinámica en *VII Jornadas de Transferencia de Tecnología sobre microbiología del Fango Activo*. Sevilla: Grupo Bioindicación de Sevilla.
- Zornoza, A., Avendaño, L., Alonso, J.L., Serrano, S., Amorós, I., Bernácer, I., y Muro, J.L. (2011) Análisis de las correlaciones entre diversos parámetros operacionales y físico-químicos relacionados con el proceso biológico de nitrificación de fangos activos en *Networking sobre Problemática Biológica en Sistemas de Eliminación de Nitrógeno*. Sevilla, Spain: Grupo Bioindicación de Sevilla.
- Zornoza, A. (2012a) *Análisis de las correlaciones entre los parámetros operacionales, físico-químicos y biológicos asociados al proceso de fangos activos*. Trabajo de Investigación Programa Doctorado Ingeniería del Agua y Medioambiental. Valencia: Universitat Politècnica de València.
- Zornoza, A., Avendaño, L., Alonso, J.L., Serrano, S., Amorós, I., Bernácer, I., y Martínez, J.L. (2012b) Análisis de las correlaciones entre parámetros operacionales y físicoquímicos relacionados con el proceso biológico de nitrificación en fangos activos. *Tecnología del Agua* **37**: 22-34.
- Zornoza, A., Gil, P., Amorós, I., y Alonso, J.L. (2013) Efecto de las variables operacionales del proceso de fangos activos en la actividad exoenzimática del grupo Mycolata en *IX Jornadas Técnicas de Transferencia de Tecnología sobre Microbiología del Fango Activo*. Sevilla, Spain: Grupo Bioindicación de Sevilla.
- Zornoza, A. (2015) Metodología para la búsqueda de microorganismos bioindicadores en fangos activos: la desesperación en la búsqueda del modelo en *Curso teórico-práctico "El papel de los protistas en los procesos de depuración de aguas residuales"*, *VII European Congress of Protistology*. Sevilla, Spain.
- Zornoza, A., Tena, S., Castillo, A., y Alonso, J.L. (2016a) Microscopía convencional vs. FISH en la identificación y cuantificación de *Candidatus* 'Microthrix parvicella' y *Candidatus* 'Microthrix parvicella' en fangos activos. *Revista Técnica de Medio Ambiente* **191**: 8-13.
- Zornoza, A., Romera, V., Lledías, M., y Alonso, J.L. (2016b) Microscopía convencional versus FISH: identificación de bacterias filamentosas tipo 021N de Eikelboom y grupo *Thiothrix nivea* en fangos activos. *Tecnoaqua* (aceptado).
- Zumft, W.G. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**: 533-616.

ANEXO

8 ANEXO

Tabla 8.1a. Media, desviación estándar (DE) y rango de la abundancia absoluta (ind/mL) de protistas, metazoos y grupos en los biorreactores.

Grupos taxonómicos	Especies/géneros	QB		DN	
		Media ± DE	Rango	Media ± DE	Rango
PEQUEÑOS FLAGELADOS					
Bodónidos	<i>Bodo saltans</i>	191 889 ± 293 726	0-1 000 000	109 003 ± 120 133	10 000-445 000
GRANDES FLAGELADOS					
Euglenidos	<i>Entosiphon sulcatum</i>	851 ± 1310	0-5260	563 ± 462	100-1800
	<i>Euglena</i> sp.	583 ± 1086	0-4800	336 ± 437	0-1520
	<i>Peranema trichophorum</i>	-	-	3 ± 9	0-40
AMEBAS					
Amebas testáceas					
Arcellidina	<i>Arcella vulgaris</i>	268 ± 352	0-1560	225 ± 295	0-1160
	<i>Centropyxis</i> sp.	8238 ± 7623	2080-32 880	5155 ± 3969	880-20 000
	<i>Pyxidicula operculata</i>	1761 ± 5650	0-28 533	1365 ± 1061	200-3480
Euglyphida	<i>Euglypha</i> sp.	1263 ± 3946	0-19 853	1317 ± 1051	200-3340
Amebas desnudas					
	<i>Amoeba</i> >50 µm	10 ± 27	0-120	3 ± 7	0-20
	<i>Amoeba</i> <50 µm	350 ± 1719	0-8600	44 ± 151	0-700
		1932 ± 1446	0-5480	1 ± 4	0-20
		4544 ± 5278	380-23 300	3790 ± 4147	80-19 520
CILIADOS					
Heterotricos	<i>Stentor roeselii</i>	9921 ± 4895	2080-20 693	5674 ± 3353	2067-17 747
Esticotricos					
	<i>Halostichia</i> sp.	1 ± 4	0-20	-	-
	<i>Oxytricha</i> sp.	6 ± 20	0-100	-	-
Hipotricos					
	<i>Aspidisca cicada</i>	1 ± 3	0-13	-	-
	<i>Euplotes affinis</i>	5 ± 20	0-100	-	-
	<i>Euplotes patella</i>	1818 ± 2376	100-8480	639 ± 428	0-2000
		1616 ± 2157	40-8480	639 ± 428	0-2000
		202 ± 679	0-2720	-	-
		-	-	-	-
Filofaringeos					
	<i>Gastronauta membranaceus</i>	560 ± 1035	0-4060	2075 ± 2079	20-8320
	<i>Pseudochilonopsis fluviatilis</i>	102 ± 368	0-1840	10 ± 21	0-80
	<i>Trithigmostoma cucullulus</i>	100 ± 189	0-680	176 ± 318	0-1440
	<i>Trochilia minuta</i>	-	-	-	-
		358 ± 770	0-3080	1890 ± 2004	0-8320
Suctores					
	<i>Acineta tuberosa</i>	145 ± 212	0-1101	193 ± 113	0-440
	<i>Metacineta mystacina</i>	66 ± 148	0-747	182 ± 114	0-440
	<i>Multifasciculatum elegans</i>	21 ± 61	0-300	-	-
	<i>Periacineta</i> sp.	4 ± 8	0-20	2 ± 8	0-40
	<i>Tokophrya infusioinum</i>	26 ± 63	0-315	9 ± 19	0-80
	<i>Tokophrya lemnaeum</i>	12 ± 22	0-80	-	-
	<i>Tokophrya quadripartita</i>	8 ± 22	0-80	-	-
	<i>Trichophrya</i> sp.	7 ± 11	0-40	1 ± 4	0-20
		2 ± 5	0-20	-	-
Peniculinos	<i>Paramecium</i> sp.	8 ± 18	0-60	-	-
Escuticociliados					
	<i>Pseudocohnilembus pusillus</i>	515 ± 1096	0-5080	125 ± 227	0-1080
	<i>Uronema nigricans</i>	92 ± 325	0-1380	83 ± 226	0-1060
		423 ± 1066	0-5080	43 ± 70	0-280
Peritricos					
	<i>Carchesium polypinum</i>	4844 ± 3101	540-13 360	1379 ± 867	20-3253
	<i>Epistylis balatonica</i>	172 ± 459	0-1687	1 ± 4	0-20
	<i>Epistylis chrysemidis</i>	1650 ± 1969	0-5640	106 ± 357	0-1720
	<i>Epistylis plicatilis</i>	201 ± 468	0-1567	10 ± 31	0-120
	<i>Opercularia articulata</i>	875 ± 1159	0-4813	1 ± 4	0-20
	<i>Opercularia coarctata</i>	201 ± 342	0-1300	477 ± 524	0-1533
	<i>Opercularia microdiscum</i>	23 ± 91	0-440	-	-
	<i>Pseudovorticella</i> sp.	-	-	-	-
	<i>Thuricala kelicottiana</i>	-	-	173 ± 420	0-1680
	Complejo <i>Vorticella aquadulcis</i>	-	-	50 ± 57	0-240
	Complejo <i>Vorticella convallaria</i>	1235 ± 1748	0-6900	310 ± 611	0-2720
	Complejo <i>Vorticella infusioinum</i>	255 ± 396	0-1440	197 ± 558	0-2640
	Complejo <i>Vorticella microstoma</i>	7 ± 29	0-147	2 ± 8	0-40
	<i>Zoothamnium</i> sp.	226 ± 571	0-2720	50 ± 99	0-360
		-	-	1 ± 5	0-20
Haptóridos					
	<i>Acineta uncinata</i>	1892 ± 2269	0-8820	1239 ± 1362	20-6740
	<i>Amphileptus punctatus</i>	1720 ± 2203	0-8580	1237 ± 1358	20-6720
	<i>Litonotus lamella</i>	128 ± 267	0-1180	-	-
Prorodóntidos					
	<i>Coleps hirtus</i>	45 ± 74	0-260	2 ± 6	0-20
	<i>Holophrya</i> sp.	131 ± 261	0-1180	23 ± 48	0-160
	<i>Plagiocampa rouxi</i>	14 ± 28	0-100	-	-
		118 ± 262	0-1180	3 ± 8	0-20
		-	-	20 ± 46	0-140
METAZOOS					
Rotíferos					
	<i>Cephalodella</i> sp.	754 ± 919	40-4200	217 ± 189	80-820
	<i>Lecane</i> sp.	685 ± 840	40-3620	203 ± 193	60-820
	<i>Rotaria</i> sp.	1 ± 4	0-20	-	-
	<i>Aelosoma variegatum</i>	621 ± 841	0-3520	109 ± 166	0-800
Anélidos					
Gastrotricos					
		64 ± 54	0-200	95 ± 110	0-440
Nematodos					
		28 ± 111	0-560	-	-
		29 ± 54	0-160	1 ± 4	0-20
		12 ± 25	0-100	12 ± 20	0-60

Tabla 8.1b. Media, desviación estándar (DE) y rango de la abundancia absoluta (ind/mL) de protistas, metazoos y grupos en los biorreactores.

Grupos taxonómicos	Especies/géneros	CXAB		CXCD	
		Media ± DE	Rango	Media ± DE	Rango
PEQUEÑOS FLAGELADOS		215 886 ± 194 583	10 000-630 000	270 000 ± 317 783	0-1 255 000
Bodónidos	<i>Bodo saltans</i>	215 886 ± 194 583	10 000-630 000	270 000 ± 317 783	0-1 255 000
GRANDES FLAGELADOS		2486 ± 7968	0-38 780	1988 ± 5192	0-25 140
Euglénidos	<i>Entosiphon sulcatum</i>	2030 ± 7958	0-38 420	1691 ± 5160	0-24 860
	<i>Euglena</i> sp.	-	-	-	-
	<i>Peranema trichophorum</i>	457 ± 577	0-1960	297 ± 412	0-1540
AMEBAS		6259 ± 5268	480-19 700	3905 ± 3856	180-14 900
Amebas testáceas		1137 ± 2112	0-7640	779 ± 1374	0-5880
Arcellidina	<i>Arcella vulgaris</i>	601 ± 1032	0-3360	330 ± 468	0-1500
	<i>Centropyxis</i> sp.	1 ± 4	0-21	5 ± 11	0-40
	<i>Pyxidicula operculata</i>	528 ± 1630	0-6780	416 ± 1069	0-4820
Euglyphida	<i>Euglypha</i> sp.	7 ± 20	0-80	28 ± 105	0-500
Amebas desnudas		5123 ± 4927	480-17 720	3126 ± 3543	180-13 680
	Amoeba >50 µm	578 ± 744	0-3520	240 ± 324	0-1439
	Amoeba <50 µm	4544 ± 4712	460-17 540	2886 ± 3352	180-13 180
CILIADOS		7100 ± 2972	2240-13 660	7987 ± 3651	3347-16 720
Heterotricos	<i>Stentor roeselii</i>	-	-	-	-
Esticotricos	<i>Holostichia</i> sp.	-	-	-	-
	<i>Oxytricha</i> sp.	-	-	-	-
Hipotricos		1351 ± 1389	20-5860	2355 ± 2414	240-10 420
	<i>Aspidisca cicada</i>	1239 ± 1387	0-5840	2187 ± 2356	200-10 220
	<i>Euplotes affinis</i>	112 ± 281	0-1300	168 ± 224	0-680
	<i>Euplotes patella</i>	-	-	-	-
Filofaringeos		462 ± 660	0-2740	707 ± 768	0-2900
	<i>Gastronauta membranaceus</i>	98 ± 172	0-760	152 ± 249	0-880
	<i>Pseudochilonopsis fluviatilis</i>	123 ± 238	0-860	194 ± 486	0-2260
	<i>Trithigmostoma cucullulus</i>	19 ± 75	0-360	2 ± 8	0-40
	<i>Trochilia minuta</i>	222 ± 390	0-1760	359 ± 610	0-2252
Suctores		219 ± 257	0-780	245 ± 248	0-760
	<i>Acineta tuberosa</i>	125 ± 192	0-620	139 ± 151	0-440
	<i>Metacineta mystacina</i>	5 ± 15	0-60	10 ± 25	0-100
	<i>Multifasciculatum elegans</i>	13 ± 35	0-160	12 ± 29	0-120
	<i>Periacineta</i> sp.	61 ± 89	0-320	68 ± 93	0-300
	<i>Tokophrya infusionum</i>	6 ± 14	0-60	10 ± 19	0-80
	<i>Tokophrya lemnae</i>	4 ± 21	0-100	1 ± 4	0-20
	<i>Tokophrya quadripartita</i>	-	-	-	-
	<i>Trichophrya</i> sp.	4 ± 10	0-40	5 ± 11	0-40
Peniculinos	<i>Paramecium</i> sp.	-	-	-	-
Escutociliados	<i>Pseudocohnilembus pusillus</i>	126 ± 186	0-660	108 ± 134	0-400
	<i>Uronema nigricans</i>	126 ± 186	0-660	108 ± 134	0-400
Peritricos		3224 ± 1636	400-7520	3333 ± 2291	823-9167
	<i>Carchesium polypinum</i>	169 ± 362	0-1680	187 ± 361	0-1533
	<i>Epistylis balatonica</i>	264 ± 333	0-1160	159 ± 215	0-747
	<i>Epistylis chrysemidis</i>	45 ± 111	0-500	44 ± 122	0-573
	<i>Epistylis plicatilis</i>	646 ± 871	0-2280	264 ± 452	0-1700
	<i>Opercularia articulata</i>	108 ± 225	0-927	237 ± 553	0-2060
	<i>Opercularia coarctata</i>	176 ± 334	0-1220	221 ± 448	0-1920
	<i>Opercularia microdiscum</i>	10 ± 20	0-60	3 ± 13	0-60
	<i>Pseudovorticella</i> sp.	-	-	-	-
	<i>Thuricala kellicottiana</i>	-	-	-	-
	Complejo <i>Vorticella aquadulcis</i>	1117 ± 1138	60-4920	1317 ± 992	160-3220
	Complejo <i>Vorticella convallaria</i>	450 ± 825	0-3340	349 ± 555	0-2360
	Complejo <i>Vorticella infusionum</i>	124 ± 332	0-1180	362 ± 1266	0-6060
	Complejo <i>Vorticella microstoma</i>	114 ± 223	0-1100	191 ± 373	0-1600
	<i>Zoothamnium</i> sp.	-	-	-	-
Haptóridos		1686 ± 1947	40-6740	1238 ± 1253	0-5080
	<i>Acineta uncinata</i>	1572 ± 1883	0-6740	1162 ± 1251	0-5080
	<i>Amphileptus punctatus</i>	24 ± 72	0-320	43 ± 145	0-700
	<i>Litonotus lamella</i>	90 ± 195	0-880	33 ± 58	0-180
Prorodóntidos		32 ± 78	0-260	3 ± 7	0-20
	<i>Coleps hirtus</i>	10 ± 37	0-179	-	-
	<i>Holophrya</i> sp.	-	-	-	-
	<i>Plagiocampa rouxi</i>	22 ± 72	0-260	3 ± 7	0-20
METAZOOS		681 ± 693	0-2360	374 ± 358	0-1000
Rotíferos		661 ± 695	0-2320	359 ± 355	0-1000
	<i>Cephalodella</i> sp.	10 ± 36	0-170	14 ± 35	0-130
	<i>Lecane</i> sp.	563 ± 615	0-2000	253 ± 255	0-780
	<i>Rotaria</i> sp.	89 ± 99	0-300	92 ± 104	0-340
Anélidos	<i>Aelosoma variegatum</i>	2 ± 5	0-20	-	-
Gastrotricos		5 ± 12	0-40	2 ± 6	0-20
Nematodos		12 ± 19	0-60	13 ± 17	0-60

Tabla 8.1c. Media, desviación estándar (DE) y rango de la abundancia absoluta (ind/mL) de protistas, metazoos y grupos en los biorreactores.

Grupos taxonómicos	Especies/género	CT1		CT2	
		Media ± DE	Rango	Media ± DE	Rango
PEQUEÑOS FLAGELADOS		96 523 ± 122 688	5000-564 880	1 561 635 ± 207 918	0-980 000
Bodónidos	<i>Bodo saltans</i>	96 523 ± 122 688	5000-564 880	1 561 635 ± 207 918	0-980 000
GRANDES FLAGELADOS		30 ± 57	0-222	111 ± 139	0-516
Euglénidos	<i>Entosiphon sulcatum</i>	-	-	2 ± 11	0-55
	<i>Euglena</i> sp.	-	-	-	-
	<i>Peranema trichophorum</i>	30 ± 57	0-222	109 ± 138	0-516
AMEBAS		4495 ± 5205	120-17 204	10 845 ± 16 131	590-68 767
Amebas testáceas		2455 ± 3993	0-16 419	2502 ± 3840	0-12 314
Arcellinida	<i>Arcella vulgaris</i>	2453 ± 3994	0-16 419	2476 ± 3845	0-12 314
	<i>Centropyxis</i> sp.	-	-	-	-
	<i>Pyxidicula operculata</i>	2 ± 8	0-40	26 ± 101	0-485
	<i>Euglypha</i> sp.	-	-	-	-
Euglyphida		2040 ± 3853	20-14 320	8343 ± 15 367	43-67 749
Amebas desnudas	Amoeba >50 µm	28 ± 58	0-280	361 ± 355	21-1173
	Amoeba <50 µm	2012 ± 3828	20-14 260	7982 ± 15 390	21-67 668
CILIADOS		7980 ± 7101	1440-26 127	9112 ± 3642	3600-18 424
Heterotricos	<i>Stentor roeselii</i>	-	-	-	-
Estichotricos	<i>Holostichia</i> sp.	-	-	-	-
	<i>Oxytricha</i> sp.	-	-	-	-
Hipotricos		5435 ± 7293	440-25 240	2894 ± 3347	0-11 025
	<i>Aspidisca cicada</i>	5434 ± 7294	440-25 240	2876 ± 3355	0-11 025
	<i>Euplotes affinis</i>	-	-	-	-
	<i>Euplotes patella</i>	2 ± 8	0-40	18 ± 56	0-259
Filofariengeos		149 ± 329	0-1540	251 ± 275	0-998
	<i>Gastronauta membranaceus</i>	50 ± 97	0-400	108 ± 212	0-907
	<i>Pseudochilodonopsis fluviatilis</i>	24 ± 61	0-260	111 ± 210	0-789
	<i>Trithigmostoma cucullulus</i>	-	-	-	-
	<i>Trochilla minuta</i>	74 ± 316	0-1510	32 ± 67	0-229
Suctores		139 ± 183	0-820	73 ± 77	0-273
	<i>Acineta tuberosa</i>	39 ± 61	0-240	34 ± 58	0-212
	<i>Metacineta mystacina</i>	-	-	-	-
	<i>Multifasciculatum elegans</i>	-	-	-	-
	<i>Periacineta</i> sp.	13 ± 26	0-100	18 ± 26	0-83
	<i>Tokophrya lemnae</i>	-	-	-	-
	<i>Tokophrya quadripartita</i>	1 ± 4	0-20	4 ± 8	0-22
	<i>Tokophrya infusioformis</i>	86 ± 188	0-820	17 ± 25	0-82
	<i>Trichophrya</i> sp.	-	-	-	-
	<i>Paramecium</i> sp.	-	-	-	-
Peniculinos		83 ± 97	0-320	233 ± 505	0-2359
Escuticociliados	<i>Pseudocohnilembus pusillus</i>	-	-	-	-
	<i>Uronema nigricans</i>	83 ± 97	0-320	233 ± 505	0-2359
Peritricos		1369 ± 958	200-3033	3621 ± 1742	359-6572
	<i>Carchesium polypinum</i>	8 ± 17	0-60	118 ± 218	0-741
	<i>Epistylis balatonica</i>	78 ± 239	0-1140	587 ± 1001	0-3920
	<i>Epistylis chrysemidis</i>	18 ± 38	0-173	58 ± 146	0-657
	<i>Epistylis plicatilis</i>	3 ± 14	0-67	12 ± 59	0-283
	<i>Opercularia articulata</i>	117 ± 320	0-1427	424 ± 786	0-2778
	<i>Opercularia coarctata</i>	12 ± 42	0-193	12 ± 52	0-248
	<i>Opercularia microdiscum</i>	-	-	-	-
	<i>Pseudovorticella</i> sp.	36 ± 74	0-320	429 ± 983	0-4189
	<i>Thuricala kellicottiana</i>	-	-	-	-
	Complejo <i>Vorticella aquadulcis</i>	838 ± 879	20-2960	1263 ± 1445	62-5437
	Complejo <i>Vorticella convallaria</i>	42 ± 66	0-260	153 ± 296	0-1341
	Complejo <i>Vorticella infusioformis</i>	62 ± 179	0-840	51 ± 122	0-455
	Complejo <i>Vorticella microstoma</i>	156 ± 278	0-1240	514 ± 944	0-4043
	<i>Zoothamnium</i> sp.	-	-	-	-
Haptóridos		802 ± 1213	0-4860	2035 ± 2099	0-9184
	<i>Acineria uncinata</i>	797 ± 1206	0-4820	1936 ± 2098	0-9184
	<i>Amphileptus punctatus</i>	3 ± 9	0-40	71 ± 215	0-1010
	<i>Litonotus lamella</i>	3 ± 7	0-20	28 ± 45	0-201
Prorodoóntidos		3 ± 13	0-59	5 ± 25	0-120
	<i>Coleps hirtus</i>	-	-	-	-
	<i>Holophrya</i> sp.	-	-	-	-
	<i>Plagiocampa rouxi</i>	3 ± 13	0-59	5 ± 25	0-120
METAZOOS		43 ± 60	0-74	106 ± 86	11-266
Rotíferos		29 ± 44	0-180	92 ± 84	0-266
	<i>Cephalodella</i> sp.	-	-	-	-
	<i>Lecane</i> sp.	17 ± 33	0-140	33 ± 43	0-129
	<i>Rotaria</i> sp.	12 ± 16	0-60	59 ± 65	0-207
Anélidos	<i>Aelosoma variegatum</i>	-	-	-	-
Gastrotricos		8 ± 18	0-80	3 ± 13	0-60
Nematodos		6 ± 11	0-40	11 ± 20	0-82

Tabla 8.2. Media, desviación estándar (DE) y rango de la abundancia absoluta (ind/mL) de protistas, metazoos y grupos en la matriz total.

Grupos taxonómicos	Especies/géneros	Media ± DE	Rango
PEQUEÑOS FLAGELADOS		174 409 ± 2 227 155	0-1 255 000
	<i>Bodo saltans</i>	174409 ± 2 227 155	0-1 255 000
GRANDES FLAGELADOS		1003 ± 3937	0-38 780
Euglénidos	<i>Entosiphon sulcatum</i>	771 ± 3887	0-38 420
	<i>Peranema trichophorum</i>	232 ± 370	0-1960
AMEBAS		6508 ± 8396	120-68 767
Amebas testáceas		1668 ± 3460	0-28 533
Arcellidina	<i>Arcella vulgaris</i>	1405 ± 2934	0-19 853
	<i>Pyxidicula operculata</i>	229 ± 1074	0-8600
Amebas desnudas		4840 ± 7589	20-67 749
	Amoeba >50 µm	564 ± 964	0-5840
	Amoeba <50 µm	4276 ± 7494	20-67 668
CILIADOS		7990 ± 4627	1440-26 127
Heterotricos		1 ± 2	0-20
Esticotricos		1 ± 9	0-100
Hipotricos		2407 ± 3840	0-25 240
	<i>Aspidisca cicada</i>	2320 ± 3824	0-25 240
	<i>Euplotes affinis</i>	82 ± 328	0-2720
Filofaríngeos		699 ± 1212	0-8320
	<i>Gastronauta membranaceus</i>	87 ± 221	0-1840
	<i>Pseudochilodonopsis fluviatilis</i>	121 ± 282	0-2260
	<i>Trochilia minuta</i>	487 ± 1115	0-8320
Suctores		169 ± 199	0-1101
	<i>Acineta tuberosa</i>	97 ± 139	0-747
	<i>Tokophrya infusionum</i>	22 ± 82	0-820
	<i>Periacineta</i> sp.	32 ± 64	0-320
Peniculinos		1 ± 8	0-60
Escutociliados		203 ± 538	0-5080
	<i>Uronema nigricans</i>	173 ± 514	0-5080
Peritricos		3027 ± 2270	20-13 360
	<i>Carchesium polypinum</i>	110 ± 302	0-1687
	<i>Epistylis balatonica</i>	491 ± 1098	0-5640
	<i>Epistylis chrysemidis</i>	65 ± 224	0-1567
	<i>Epistylis plicatilis</i>	308 ± 712	0-4813
	<i>Opercularia articulata</i>	260 ± 504	0-2778
	<i>Opercularia coarctata</i>	73 ± 244	0-1920
	Complejo <i>Vorticella aquadulcis</i>	1017 ± 1234	0-6900
	Complejo <i>Vorticella convallaria</i>	241 ± 515	0-3340
	Complejo <i>Vorticella infusionum</i>	100 ± 542	0-6060
	Complejo <i>Vorticella microstoma</i>	209 ± 512	0-4043
Haptóridos		1488 ± 1773	0-9184
	<i>Acinera uncinata</i>	1409 ± 1735	0-9184
	<i>Amphileptus punctatus</i>	46 ± 161	0-1180
	<i>Litonotus lamella</i>	33 ± 93	0-880
Prorodontidos		34 ± 124	0-1180
METAZOOS		368 ± 570	0-4200
Rotíferos		343 ± 541	0-3620
	<i>Lecane</i> sp.	271 ± 508	0-3520
	<i>Rotaria</i> sp.	68 ± 85	0-440
Anélidos		5 ± 48	0-560
Gastrotricos		8 ± 27	0-160
Nematodos		11 ± 19	0-100

Tabla 8.3a. Media, desviación estándar (DE) y rango de las variables fisicoquímicas medidas en el afluente, efluente y rendimientos en los biorreactores.

Parámetros	Unidades	EDAR DN		EDAR CT1		EDAR CT2	
		Media ± DE	Rango	Media ± DE	Rango	Media ± DE	Rango
SST afluente	mg/L	184 ± 71	82-382	126 ± 32	59-205	164 ± 104	45-565
SST efluente	mg/L	4,0 ± 2,4	1,0-10	24 ± 26	5,7-92	24 ± 38	5-177
rSST	%	97,7 ± 1,3	95-99	78 ± 28	0-96	82 ± 27	0-98
DQO afluente	mg/L	312 ± 157	42-765	372 ± 84	188-548	395 ± 123	214-775
DQO efluente	mg/L	22,6 ± 4,8	13-31	58 ± 47	20 - 214	58 ± 75	26-361
rDQO	%	90,5 ± 6,2	68-97	83 ± 16	36-94	84 ± 22	0-94
DQO ₅ afluente	mg/L	101 ± 36	27-159	169 ± 56	81-269	68 ± 152	64-280
DQO ₅ efluente	mg/L	19,6 ± 4,2	9,3-28	34 ± 16	20-97	30,0 ± 3,9	23-40
rDQO ₅	%	77 ± 13	32-88	76 ± 19	0-90	75 ± 14	38-90
DBO ₅ afluente	mg/L	159 ± 64	30-140	180 ± 55	95-270	197 ± 77	80-380
DBO ₅ efluente	mg/L	6,5 ± 1,4	4-9	19 ± 24	4,0-110	16 ± 23	4,0-110
rDBO ₅	%	95,2 ± 2,4	87-98	88 ± 18	15-98	90 ± 20	0-98
DBO ₅ f afluente	mg/L	81 ± 29	20-120	96 ± 34	40-160	78 ± 46	24-190
DBO ₅ f efluente	mg/L	5,8 ± 1,4	4,0-9,0	9,3 ± 11,3	4,0-55	6,3 ± 2,7	3,0-13
rDBO ₅ f	%	91,4 ± 4,6	80-96	86 ± 24	0-97	88 ± 10	58-97
NT afluente	mg/L	52 ± 18	26-103	59 ± 11	36-80	62 ± 14	39-92
NT efluente	mg/L	7,2 ± 1,9	3,6-11	35 ± 11	20-54	34,1 ± 8,3	22-52
rNT	%	85,3 ± 4,4	78-92	40 ± 11	16-57	44 ± 11	20-65
NTs afluente	mg/L	40 ± 13	18-63	51,1 ± 9,7	35-78	52 ± 15	35-87
NTs efluente	mg/L	6,4 ± 1,6	3,3-9,4	33 ± 11	17-53	32,0 ± 7,7	20-48
rNTs	%	82,9 ± 5,4	69-91	36 ± 14	4,0-61	37 ± 10	20-57
NKT efluente	mg/L	3,2 ± 1,5	0,9-6,8	32 ± 12	13-52	31,1 ± 9,2	18-50
rNKT	%	93,6 ± 2,8	86-99	46 ± 15	17-72	39 ± 13	8,4-60
NKTs efluente	mg/L	2,4 ± 1,1	0,5-4,8	30 ± 13	12-52	29 ± 8,5	16-46
rNKTs	%	93,4 ± 3,5	83-99	43 ± 18	5,3-71	43 ± 11	23-62
N-NH ₄ ⁺ afluente	mg/L	27 ± 13	5,3-56	46,6 ± 7,6	32-66	45,4 ± 9,5	32-66
N-NH ₄ ⁺ efluente	mg/L	0,2 ± 0,3	<0,1-1,2	27 ± 12	4,4-45	26,8 ± 8,0	15-42
rN-NH ₄ ⁺	%	98,7 ± 2,7	89-99	44 ± 21	10-90	41 ± 12	15-63
N-NO ₂ efluente	mg/L	0,1 ± 0,1	<0,1-0,3	2,0 ± 1,7	<0,1-5,2	1,3 ± 0,9	<0,1-3,2
N-NO ₂ efluente	%	1,2 ± 1,4	0,05-5,3	52 ± 24	0,60-91	3,0 ± 1,7	0,50-68
N-NO ₃ efluente	mg/L	3,9 ± 1,7	1,7-7,2	1,5 ± 1,2	0,5-4,7	1,7 ± 1,0	0,5-3,6
Nox	mg/L	4,0 ± 1,7	1,7-7,2	3,5 ± 2,3	0,5-7,6	3,0 ± 1,7	0,5-6,8

Tabla 8.3b. Media, desviación estándar (DE) y rango de las variables fisicoquímicas medidas en el afluente, efluente y rendimientos en los biorreactores.

Parámetros	Unidades	EDAR QB		EDAR CX	
		Media ± DE	Rango	Media ± DE	Rango
SST afluente	mg/L	119 ± 34	68-202	162 ± 97	65-400
SST efluente	mg/L	47 ± 59	3,0-211	10,0 ± 5,2	4,7-25
rSST	%	68 ± 34	0-97	93,0 ± 2,9	88-99
DQO afluente	mg/L	418 ± 162	204-804	332 ± 174	87-795
DQO efluente	mg/L	100 ± 84	38-352	39 ± 11	25-63
rDQO	%	76 ± 16	31-96	86,5 ± 4,8	71-95
DQOs afluente	mg/L	221 ± 109	90-496	88 ± 25	39-145
DQOs efluente	mg/L	49 ± 13	34-96	25,4 ± 5,5	13-37
rDQOs	%	74,6 ± 9,4	53-89	69,5 ± 9,4	44-90
DBO ₅ afluente	mg/L	244 ± 111	90-480	141 ± 48	50-255
DBO ₅ efluente	mg/L	17 ± 13	4,0-49	8,3 ± 2,7	4,0-14
rDBO ₅	%	93,1 ± 5,8	73-100	93,5 ± 3,0	83-97
DBO ₅ f afluente	mg/L	137 ± 88	50-390	-	-
DBO ₅ f efluente	mg/L	6,1 ± 4,5	2,0-19	-	-
rDBO ₅ f	%	94,4 ± 5,4	76-98	-	-
NT afluente	mg/L	54 ± 17	32-84	48 ± 18	20-89
NT efluente	mg/L	22 ± 13	6,5-48	22,8 ± 7,7	8,9-39
rNT	%	61 ± 15	35-83	50 ± 13	22-67
NTs afluente	mg/L	45 ± 16	24-72	-	-
NTs efluente	mg/L	18,7 ± 11,3	5,6-45	-	-
rNTs	%	61 ± 15	28-83	-	-
NKT efluente	mg/L	15 ± 12	1,5-42	10,5 ± 8,6	1,4-30
rNKT	%	75 ± 16	44-96	59 ± 21	21-88
NKTs efluente	mg/L	11 ± 10	1,0-36	-	-
rNKTs	%	78 ± 17	45-96	-	-
N-NH ₄ ⁺ afluente	mg/L	40 ± 12	24-62	25,7 ± 7,5	7,1-41
N-NH ₄ ⁺ efluente	mg/L	9,2 ± 9,7	0,1-33	4,4 ± 6,3	0,1-19
rN-NH ₄ ⁺	%	80 ± 19	42-99	84 ± 23	19-99
N-NO ₂ ⁻ efluente	mg/L	1,4 ± 1,5	<0,1-5,7	0,7 ± 0,5	<0,1-1,8
N-NO ₂ ⁻ efluente	%	16 ± 13	1,1-50	5,8 ± 4,3	0,16-14
N-NO ₃ ⁻ efluente	mg/L	6,2 ± 2,6	0,4-11	11,6 ± 3,4	6,5-19
Nox	mg/L	7,6 ± 3,2	0,4-13	12,3 ± 3,5	7,4-19

Tabla 8.4. Media, desviación estándar (DE) y rango de las variables físicoquímicas en el afluente, efluente y rendimientos de la matriz total.

Parámetros	Unidades	Media ± DE	Rango
SST afluente	mg/L	150 ± 76	45-565
SST efluente	mg/L	20 ± 34	1-211
rSST	%	85 ± 23	0-99
DQO afluente	mg/L	367 ± 147	42-804
DQO efluente	mg/L	54 ± 56	13-361
rDQO	%	84 ± 14	0-97
DQOs afluente	mg/L	148 ± 82	27-496
DQOs efluente	mg/L	31 ± 13	9,3-97
rDQOs	%	74 ± 13	0-90
DBO ₅ afluente	mg/L	185 ± 82	30-480
DBO ₅ efluente	mg/L	13 ± 15	4-110
rDBO ₅	%	92 ± 12	0-98
DBO ₅ f afluente	mg/L	98 ± 59	20-390
DBO ₅ f efluente	mg/L	6,9 ± 6,3	2-55
rDBO ₅ f	%	90 ± 14	0-98
NT afluente	mg/L	55 ± 16	20-103
NT efluente	mg/L	24 ± 13	3,6-54
rNT	%	55 ± 19	16-92
NTs afluente	mg/L	47 ± 14	18-87
NTs efluente	mg/L	23 ± 14	3,3-53
rNTs	%	54 ± 23	4-91
NKT efluente	mg/L	17 ± 14	0,9-52
rNKT	%	62 ± 24	8,4-98
NKTs efluente	mg/L	18 ± 15	0,5-92
rNKTs	%	65 ± 26	5,3-99
N-NH ₄ ⁺ afluente	mg/L	37 ± 13	5,3-66
N-NH ₄ ⁺ efluente	mg/L	12 ± 13	0,03-45
rN-NH ₄ ⁺	%	72 ± 28	10-99
N-NO ₂ ⁻ efluente	mg/L	1,0 ± 1,2	0,002-5,7
N-NO ₂ ⁻ efluente	%	14,1 ± 20,9	0,05-91,5
N-NO ₃ ⁻ efluente	mg/L	6,1 ± 4,8	0,4-19
Nox	mg/L	7,1 ± 4,8	0,4-19

Tabla 8.5a. Media, desviación estándar (DE) y rango de las variables fisicoquímicas medidas en el licor mezcla.

Parámetros	Unidades	EDAR QB		EDAR CXAB		EDAR CXCD	
		Media ± DE	Rango	Media ± DE	Rango	Media ± DE	Rango
pHLM	Ud.	7,44 ± 0,18	7,05-7,79	7,44 ± 0,20	7,00-7,88	7,46 ± 0,15	7,08-7,76
CondLM	µS/cm	2042 ± 425	1330-2740	1625 ± 351	946-2540	1607 ± 299	984-2150
NLTM	mg/g SSVLM	71 ± 21	41-108	96 ± 18	72-140	96 ± 18	67-138
PTLM	mg/g SSVLM	29 ± 5	19-40	24,3 ± 4,8	19-39	25,7 ± 4,7	20-40
DQLM	g/g SSVLM	1,42 ± 0,10	1,25-1,63	1,38 ± 0,09	1,21-1,54	1,39 ± 0,11	1,15-1,67
SSLM	mg/L	2460 ± 386	1790-3120	1938 ± 549	1100-2980	1831 ± 450	1080-2770
SSVLM	mg/L	1947 ± 305	1455-2498	1605 ± 436	905-2410	1513 ± 364	364-2290
SSVLM	%	79,2 ± 3,7	68-87	83,1 ± 4,6	70-91	82,8 ± 4,1	73-88
SSR	mg/L	3821 ± 595	2730-4860	2691 ± 885	1575-5740	2691 ± 885	1575-5740
R. rec	-	1,6 ± 0,3	1,0-2,2	1,4 ± 0,4	0,9-2,3	1,4 ± 0,4	0,9-2,3
IVF30	mL/g	119 ± 27	59-167	112 ± 29	74-200	131 ± 60	76-286
IVF5	mL/g	228 ± 56	100-324	216 ± 75	119-415	256 ± 152	126-714
T _r	°C	21,3 ± 3,7	14-29	20,2 ± 3,5	15-27	20,3 ± 3,6	15-26

Tabla 8.5b. Media, desviación estándar (DE) y rango de las variables fisicoquímicas medidas en el licor mezcla.

Parámetros	Unidades	EDAR DN		EDAR CT1		EDAR CT2	
		Media ± DE	Rango	Media ± DE	Rango	Media ± DE	Rango
pHLM	Ud.	7,40 ± 0,26	6,92-8,00	7,17 ± 0,20	6,65-7,51	7,20 ± 0,21	6,85-7,60
CondLM	µS/cm	2784 ± 1050	986-5440	2968 ± 761	1875-4850	2906 ± 691	1895-4840
NLTM	mg/g SSVLM	58 ± 12	31-78	54 ± 19	30-96	52 ± 23	31-109
PTLM	mg/g SSVLM	35,1 ± 3,7	28-43	62 ± 11	42-90	57 ± 13	27-76
DQLM	g/g SSVLM	1,45 ±	0,09	1,43 ± 0,11	1,26-1,77	1,42 ± 0,06	1,30-1,53
SSLM	mg/L	3225 ± 290	2500-3780	4055 ± 1048	2640-6240	4127 ± 1157	2460-6800
SSVLM	mg/L	2239 ± 230	1790-2730	2920 ± 783	1840-4550	2997 ± 890	1490-4920
SSVLM	%	69,4 ± 3,3	62-75	72,0 ± 3,2	64-78	72,2 ± 4,7	61-81
SSR	mg/L	3945 ± 1245	2030- 6949	5544 ± 1709	2960-10760	5816 ± 1648	2760 - 8710
R. rec	-	1,8 ± 0,7	0,7-3,5	1,4 ± 0,4	0,7-2,0	1,4 ± 0,3	0,9-2,0
IVF30	mL/g	109 ± 15	85-140	110 ± 20	81-161	109 ± 29	64-160
IVF5	mL/g	193 ± 30	146-241	195 ± 36	145-273	209 ± 51	123-300
T _r	°C	18,5 ± 4,2	11-26	22,0 ± 4,0	16-29	22,1 ± 4,1	15-29

Tabla 8.6a. Media, desviación estándar (DE) y rango de las variables fisicoquímicas medidas en el afluente.

Parámetros	Unidades	EDAR QB		EDAR CX	
		Media ± DE	Rango	Media ± DE	Rango
%DQOs	%	52,0 ± 8,2	42-75	29,0 ± 8,7	7,8-45
CNT	g/Kg SSVLM.d	49 ± 20	29-102	117 ± 46	41-186
CN-NH ₄ ⁺	g/Kg SSVLM.d	37 ± 14	22-77	63 ± 23	14-100
CPT	g/Kg SSVLM.d	4,8 ± 2,0	1,8-9,0	15,2 ± 7,0	3,8-30
CP-PO ₄ ³⁻	g/Kg SSVLM.d	2,3 ± 1,3	0,72-5,4	11,4 ± 4,8	2,2-19
DQO/DBO ₅	-	1,75 ± 0,20	1,4-3,1	2,19 ± 0,45	1,60-3,46
DBO ₅ /NT	-	4,5 ± 1,1	2,7-7,9	3,1 ± 0,7	2,2-5,4
DBO ₅ /PT	-	47 ± 14	24-98	24,8 ± 6,1	17-41
CS ²⁻	g/Kg SSVLM.d	0,02 ± 0,11	<0,1-0,55	0,02 ± 0,10	<0,1-0,46
CSO ₄ ²⁻	Kg/Kg SSVLM.d	0,21 ± 0,05	0,12-0,33	0,84 ± 0,25	0,43-1,38
CAG	g/Kg SSVLM.d	14,2 ± 7,8	4,0-32	24 ± 13	4,1-51
CAGV	g/Kg SSVLM.d	31 ± 62	<1-297	8,6 ± 23,6	<1-109
CProt	g/Kg SSVLM.d	60 ± 29	25-141	95 ± 38	18-154
CCarb	g/Kg SSVLM.d	8,4 ± 4,2	3,7-19	17 ± 12	4,1-60
CNi	g/Kg SSVLM.d	0,11 ± 0,16	<0,1-0,50	-	-
CZn	g/Kg SSVLM.d	1,8 ± 1,4	0,12-5,2	-	-
CTA	g/Kg SSVLM.d	3,1 ± 2,1	0,87-10	-	-

Tabla 8.6b. Media, desviación estándar (DE) y rango de las variables fisicoquímicas medidas en el afluente.

Parámetros	Unidades	EDAR DN		EDAR CT1		EDAR CT2	
		Media ± DE	Rango	Media ± DE	Rango	Media ± DE	Rango
%DQOs	%	37 ± 13	15-64	45 ± 10	24-66	38 ± 13	15-62
CNT	g/Kg SSVLM.d	38 ± 11	19-62	92 ± 22	38-147	95 ± 34	48-163
CN-NH ₄ ⁺	g/Kg SSVLM.d	19,7 ± 8,2	4,8-34	73 ± 17	34-121	70 ± 23	32-117
CPT	g/Kg SSVLM.d	3,5 ± 1,1	0,69-6,0	16,4 ± 6,2	5,9-37	17,8 ± 8,0	7,4-35
CP-PO ₄ ³⁻	g/Kg SSVLM.d	2,2 ± 1,3	0,17-4,4	12,1 ± 5,0	4,2-30	11,6 ± 4,3	4,9-20
DQO/DBO ₅	-	1,89 ± 0,28	1,38-2,26	2,14 ± 0,38	1,63-3,13	2,15 ± 0,56	1,23-3,28
DBO ₅ /NT	-	3,1 ± 1,2	1,2-6,6	3,07 ± 0,77	1,6-4,7	3,2 ± 1,2	1,5-6,7
DBO ₅ /PT	-	34,0 ± 6,7	18-47	10,5 ± 3,6	5,0-20	18,3 ± 8,4	7,9-40
CS ²⁻	g/Kg SSVLM.d	2,3 ± 4,4	0,02-16	3,0 ± 3,8	0,41-15	3,1 ± 3,7	0,36-14
CSO ₄ ²⁻	Kg/Kg SSVLM.d	0,19 ± 0,06	0,11-0,31	0,42 ± 0,09	0,23-0,58	0,41 ± 0,15	0,15-0,71
CAG	g/Kg SSVLM.d	8,6 ± 4,5	0,90-16	25,5 ± 9,9	5,3-50	30 ± 10	14-51
CAGV	g/Kg SSVLM.d	1,4 ± 3,9	<1-16	41 ± 41	<1-127	45 ± 35	<1-107
CProt	g/Kg SSVLM.d	21,4 ± 9,8	3,6-40	90 ± 24	47-147	85 ± 30	41-153
CCarb	g/Kg SSVLM.d	3,4 ± 1,8	1,9-10	11,3 ± 3,6	6,7-22	10,0 ± 3,7	5,2-19
CNi	g/Kg SSVLM.d	-	-	-	-	-	-
CZn	g/Kg SSVLM.d	-	-	-	-	-	-
CTA	g/Kg SSVLM.d	-	-	-	-	-	-

Tabla 8.7a. Media, desviación estándar (DE) y rango de las variables operacionales.

Parámetros	Unidades	EDAR QB		EDAR CXAB		EDAR CXCD	
		Media ± DE	Rango	Media ± DE	Rango	Media ± DE	Rango
CM1	Kg DBO ₅ /Kg SSVLM.d	0,25 ± 0,16	0,09-0,85	0,33 ± 0,12	0,10-0,51	0,33 ± 0,12	0,14-0,61
CM2a	Kg DBO ₅ /Kg SSVLM.d	0,23 ± 0,12	0,10-0,64	0,31 ± 0,10	0,10-0,51	0,33 ± 0,13	0,13-0,54
CM2b	Kg DBO ₅ /Kg SSVLM.d	0,18 ± 0,07	0,08-0,33	0,26 ± 0,11	0,09-0,46	0,28 ± 0,11	0,11-0,52
CM3	Kg DBO ₅ /Kg SSVLM.d	0,20 ± 0,09	0,08-0,47	0,29 ± 0,10	0,12-0,43	0,30 ± 0,10	0,14-0,49
CM1	Kg DQOs/Kg SSVLM.d	0,23 ± 0,17	0,10-0,92	0,20 ± 0,08	0,07-0,34	0,20 ± 0,07	0,09-0,42
CM2a	Kg DQOs/Kg SSVLM.d	0,21 ± 0,12	0,09-0,69	0,19 ± 0,07	0,07-0,34	0,20 ± 0,06	0,09-0,30
CM2b	Kg DQOs/Kg SSVLM.d	0,16 ± 0,06	0,06-0,29	0,16 ± 0,06	0,08-0,29	0,17 ± 0,06	0,09-0,33
CM3	Kg DQOs/Kg SSVLM.d	0,18 ± 0,09	0,10-0,49	0,17 ± 0,05	0,08-0,29	0,18 ± 0,05	0,10-0,24
TRHr1	horas	14,3 ± 3,3	8,7-25	6,5 ± 0,4	5,6-6,9	6,5 ± 0,4	5,6-6,9
TRHr2a	horas	15,4 ± 2,6	11-24	6,4 ± 0,4	5,0-6,8	6,4 ± 0,4	5,0-6,8
TRHr2b	horas	18,4 ± 2,3	15-24	6,4 ± 0,4	5,1-6,9	6,4 ± 0,4	5,1-6,9
TRHr3	horas	17,0 ± 2,0	14-22	6,4 ± 0,4	5,3-6,9	6,4 ± 0,4	5,3-6,8
TRHds1	horas	5,8 ± 1,5	3,8-8,4	9,4 ± 0,6	8,1-10	8,1 ± 0,6	6,9-8,7
TRHds2a	horas	6,1 ± 1,3	4,2-8,7	9,2 ± 0,6	7,2-9,8	8,0 ± 0,6	6,3-8,6
TRHds2b	horas	7,3 ± 1,3	5,2-9,6	9,2 ± 0,6	7,3-9,9	8,0 ± 0,6	6,4-4,7
TRHds3	horas	6,8 ± 1,2	5,0-9,2	9,2 ± 0,5	7,6-9,9	8,0 ± 0,5	6,6-8,6
EF1	días	40 ± 155	3,0-785	7,1 ± 5,0	3,0-23	7,2 ± 5,4	2,2-28
EF2	días	12 ± 10	2,9-52	6,8 ± 4,4	2,7-21	6,5 ± 4,7	2,5-24
EF3	días	12,0 ± 7,2	3,5-36	6,6 ± 4,4	2,8-21	6,4 ± 4,5	2,7-22
EF4	días	11,0 ± 5,7	4,6-28	6,9 ± 4,7	3,2-22	6,5 ± 4,6	2,8-22
EF5	días	10,8 ± 6,1	5,1-32	7,2 ± 5,0	3,3-22	6,8 ± 4,8	2,8-22
EF6	días	10,8 ± 6,1	5,3-31	7,4 ± 5,1	3,5-22	7,0 ± 4,8	2,8-22
EF7	días	10,8 ± 5,7	5,2-29	7,5 ± 5,2	3,3-22	7,1 ± 4,9	2,7-22
CO ₃	Kg O ₃ /d	-	-	-	-	-	-
ODb	%	36 ± 25	0-92	0,7 ± 3,5	0-17	10 ± 19	0-67
ODm	%	61 ± 24	8-96	2,2 ± 7,5	0-35	26 ± 23	0-73
ODa	%	2,9 ± 9,5	0-35	97 ± 11	48-100	63 ± 23	27-100

Tabla 8.7b. Media, desviación estándar (DE) y rango de las variables operacionales.

Parámetros	Unidades	EDAR DN		EDAR CT1		EDAR CT2	
		Media ± DE	Rango	Media ± DE	Rango	Media ± DE	Rango
CM1	Kg DBO ₅ /Kg SSVLM.d	0,11 ± 0,04	0,03-0,19	0,29 ± 0,11	0,10-0,55	0,30 ± 0,11	0,11-0,56
CM2a	Kg DBO ₅ /Kg SSVLM.d	0,12 ± 0,03	0,05-0,17	0,28 ± 0,11	0,13-0,62	0,27 ± 0,10	0,12-0,51
CM2b	Kg DBO ₅ /Kg SSVLM.d	0,14 ± 0,04	0,09-0,24	0,28 ± 0,10	0,12-0,65	0,25 ± 0,11	0,13-0,60
CM3	Kg DBO ₅ /Kg SSVLM.d	0,13 ± 0,04	0,03-0,19	0,28 ± 0,10	0,14-0,57	0,27 ± 0,10	0,15-0,53
CM1	Kg DQOs/Kg SSVLM.d	0,07 ± 0,02	0,02-0,10	0,27 ± 0,10	0,12-0,51	0,23 ± 0,08	0,11-0,42
CM2a	Kg DQOs/Kg SSVLM.d	0,08 ± 0,03	0,04-0,14	0,26 ± 0,06	0,15-0,39	0,21 ± 0,05	0,10-0,35
CM2b	Kg DQOs/Kg SSVLM.d	0,10 ± 0,03	0,03-0,16	0,27 ± 0,06	0,15-0,37	0,21 ± 0,05	0,09-0,34
CM3	Kg DQOs/Kg SSVLM.d	0,09 ± 0,02	0,03-0,12	0,26 ± 0,06	0,15-0,37	0,21 ± 0,05	0,09-0,36
TRHr1	horas	14,6 ± 2,2	12-18	5,4 ± 0,5	4,5-6,3	5,4 ± 0,5	4,5-6,7
TRHr2a	horas	14,8 ± 2,9	12-19	5,5 ± 0,5	4,7-6,3	5,4 ± 0,5	4,7-6,7
TRHr2b	horas	15,0 ± 1,9	12-19	5,5 ± 0,5	4,6-6,5	5,4 ± 0,4	4,8-6,2
TRHr3	horas	14,9 ± 1,9	12-19	5,5 ± 0,5	4,7-6,3	5,4 ± 0,4	4,9-6,2
TRHds1	horas	6,5 ± 1,0	5,1-8,2	4,9 ± 0,5	4,0-5,7	5,2 ± 0,5	4,3-6,5
TRHds2a	horas	6,6 ± 0,8	5,5-8,4	4,9 ± 0,5	4,2-5,7	5,2 ± 0,5	4,5-6,5
TRHds2b	horas	6,7 ± 0,8	5,5-8,5	5,0 ± 0,5	4,1-5,8	5,3 ± 0,5	4,7-6,3
TRHds3	horas	6,6 ± 0,8	5,5-8,4	4,9 ± 0,5	4,2-5,6	5,3 ± 0,4	4,7-6,3
EF1	días	450 ± 585	7,2-1778	5,7 ± 1,9	2,6-9,8	8,0 ± 7,3	3,4-37,3
EF2	días	133 ± 27	8,2-1061	5,9 ± 1,7	2,7-8,9	8,4 ± 5,9	5,9-31
EF3	días	22 ± 10	8,4-40	5,8 ± 1,8	3,0-11	8,1 ± 4,9	4,9-26
EF4	días	26 ± 22	9,6-95	5,7 ± 1,7	3,1-11	7,7 ± 3,7	3,7-19,0
EF5	días	25 ± 23	9,5-109	5,7 ± 1,7	3,0-10	7,5 ± 2,8	3,3-14
EF6	días	20 ± 14	9,2-72	5,7 ± 1,6	3,1-9,4	7,4 ± 2,9	3,0-14
EF7	días	17,2 ± 5,4	10-35	5,6 ± 1,5	2,9-8,7	7,3 ± 2,7	3,1-13
CO ₃	Kg O ₃ /d	-	-	19 ± 20	0-48	18 ± 19	0-47
ODb	%	66 ± 11	44-82	43 ± 27	0-94	52 ± 27	0-99
ODm	%	32 ± 11	18-57	40 ± 25	0-84	43 ± 17	13-79
ODa	%	1,1 ± 1,1	0-2,9	57 ± 22	19-94	53 ± 16	31-87

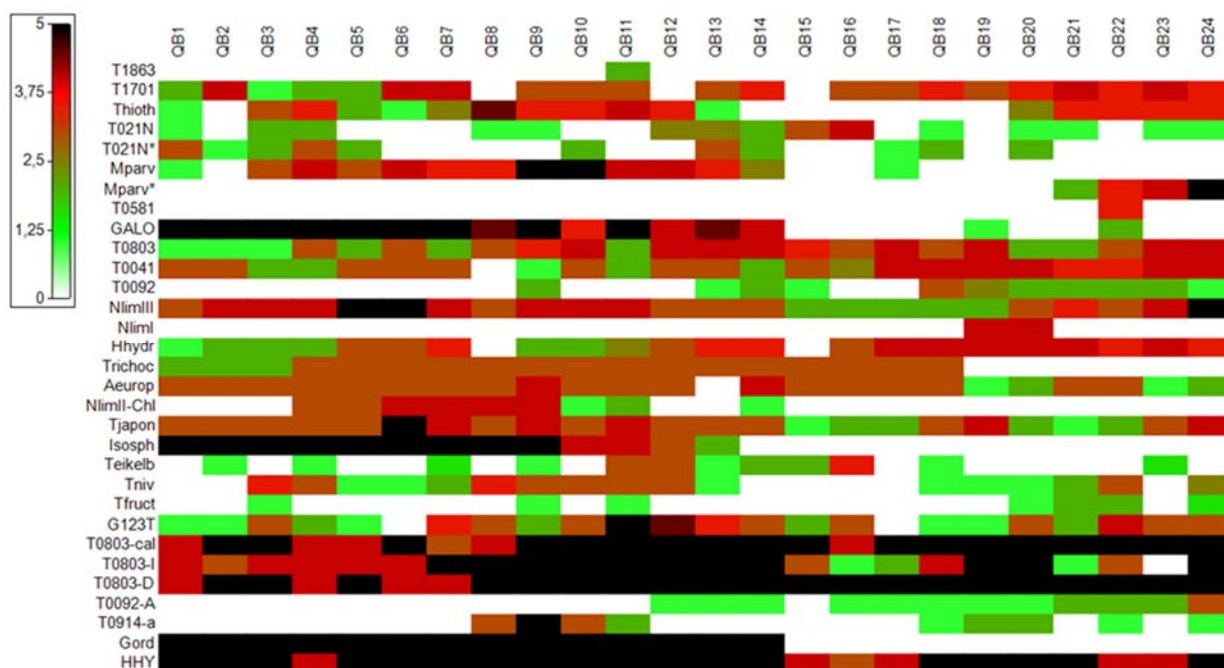


Figura 8.1. Abundancia absoluta de bacterias filamentosas en QB, representada a través del trazado sombreado (*shade plot*).



Figura 8.2. Abundancia absoluta de bacterias filamentosas en CXAB, representada a través del trazado sombreado (*shade plot*).

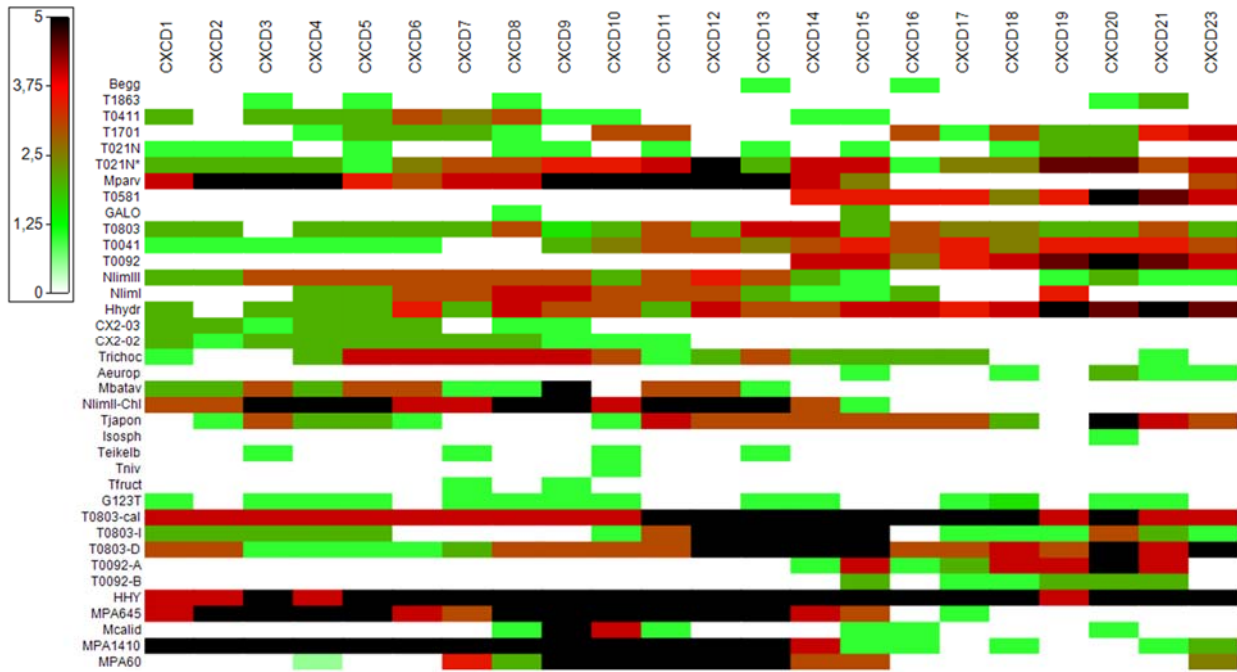


Figura 8.3. Abundancia absoluta de bacterias filamentosas en CXCD, representada a través del trazado sombreado (*shade plot*).

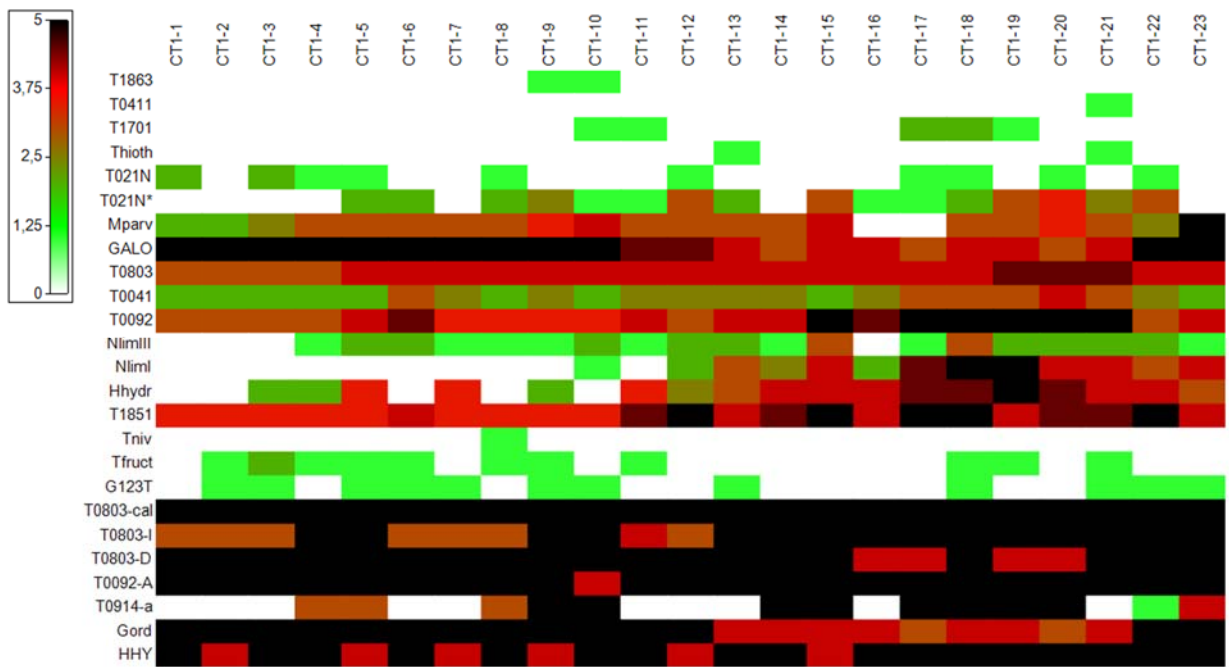


Figura 8.4. Abundancia absoluta de bacterias filamentosas en CT1 representada a través del trazado sombreado (*shade plot*).

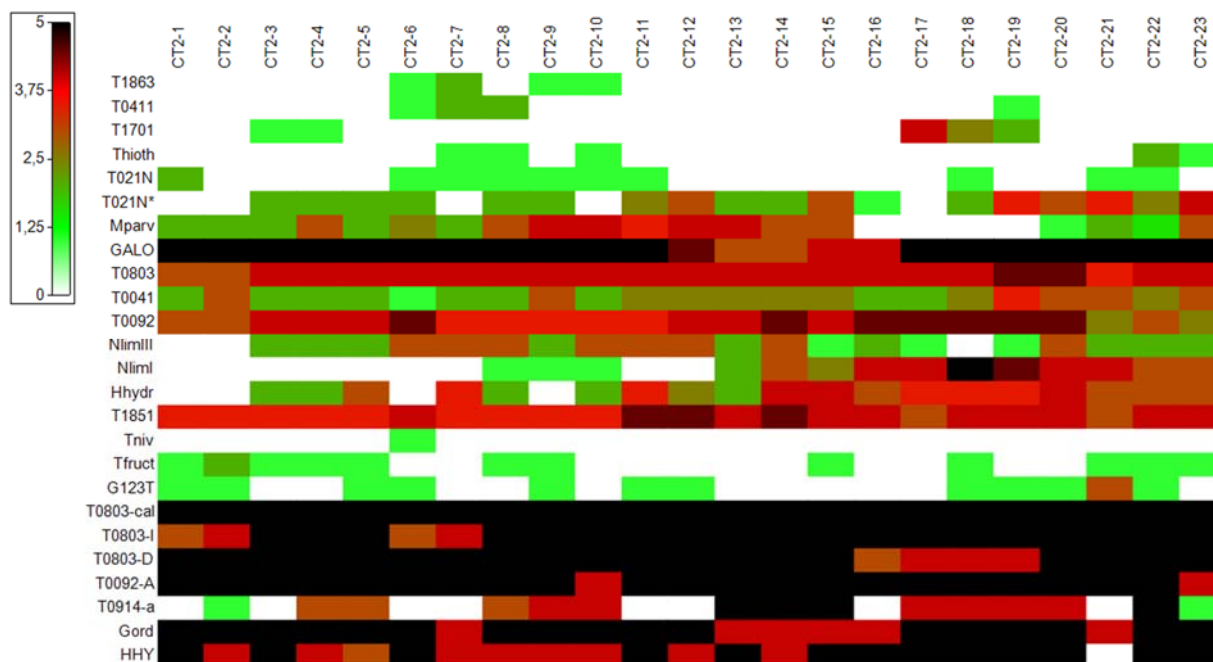


Figura 8.5. Abundancia absoluta de bacterias filamentosas en CT2 representada a través del trazado sombreado (*shade plot*).

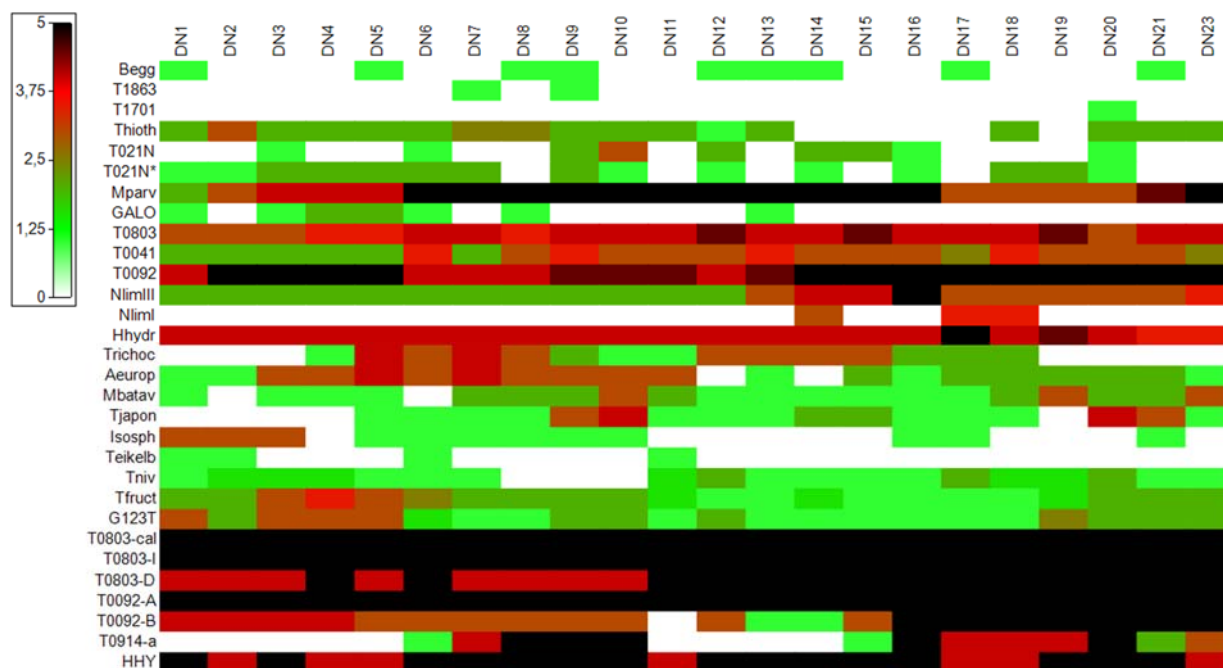


Figura 8.6. Abundancia absoluta de bacterias filamentosas en DN, representada a través del trazado sombreado (*shade plot*).

Tabla 8.8a. Rango del IF de las bacterias filamentosas identificadas en los biorreactores mediante la técnica FISH y microscopía convencional.

Filo	Sonda FISH	Especificidad	Morfortipo	QB	DN	
				Rango	Rango	
<i>Proteobacteria</i>	MC2-649	Clase <i>Alphaproteobacteria</i>				
		Ca. 'Monilibacter batavus'	<i>Nostocoida limicola</i> II	-	0-3	
	Noli-644	Ca. 'Alysiosphaera europaea'	<i>Nostocoida limicola</i> II	0-4	0-4	
	G123T	Clase <i>Betaproteobacteria</i>				
			Tipo 1701 ^(MC) (1)	0-4	0-1	
		Clase <i>Gammaproteobacteria</i>				
	G2M	<i>Thiothrix</i> sp.		0-5	1-3	
	TNI	<i>Thiothrix eikelboomii</i> (Grupo II)	Tipo 021N	0-3,5	0-1	
	TFR			Tipo 021N ^(MC)	0-4	0-3
			<i>Thiothrix nivea</i>	<i>Thiothrix</i>	0-3,5	0-1
			<i>Thiothrix fructosivorans</i>	<i>Thiothrix</i>	0-2	1-3,5
				<i>Thiothrix</i> (I, II) ^(MC)	0-4,5	0-3
				Tipo 1863 ⁽¹⁾	0-2	0-1
	<i>Bacteroidetes</i>	HHY	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	<i>Beggiatoa</i> sp. ⁽¹⁾	-	0-1
				<i>H. hydrossis</i>	3-5	4-5
<i>H. hydrossis</i> ^(MC)				0-4	3,5-5	
Tipo 0411 ⁽¹⁾				-	-	
<i>Chloroflexi</i>	CFX197	Tipo 0092 (variante A)	Tipo 0092	0-3	5-5	
	CFX223	Tipo 0092 (variante B)	Tipo 0092	-	0-5	
			Tipo 0092 ^(MC)	0-3	4-5	
	Caldi-0678	Género <i>Caldilinea</i>		3-5	5-5	
	T0803-0654	Tipo 0803 (clase <i>Caldilineae</i>)	Tipo 0803	4-5	4-5	
	T0803ind-0657	Tipo 0803 (clase <i>Caldilineae</i>)	Tipo 0803	0-5	5-5	
	CFX67a	Tipo 0914	Tipo 0914	0-5	0-5	
	CFX67b	Tipo 0914	Tipo 0914	-	-	
	AHW183	<i>Nostocoida limicola</i>	<i>Nostocoida limicola</i> II	0-4	-	
			Tipo 0803/0914 ^(MC)	1-4	3-4,5	
<i>Actinobacteria</i>	MPA645	Ca. 'Microthrix parvicella'				
	MPA60	Ca. 'Microthrix parvicella'	<i>Microthrix parvicella</i>	*	*	
	Mpa-all-1410	<i>Microthrix</i>	<i>Microthrix parvicella</i>	*	*	
	Mpa-T1-1260	Ca. 'Microthrix calida'	<i>Microthrix parvicella</i>	*	*	
	Gor0596	<i>Gordonia</i> sp.	<i>Microthrix parvicella</i> ^(MC)	0-5	2-5	
			GALO	0-5	*	
			GALO ^(MC)	0-5	0-2	
	NLIMIII192	<i>Tetrasphaera japonica</i>	<i>Nostocoida limicola</i> II	1-5	0-4	
	<i>Firmicutes</i>	Nlim191	<i>Trichococcus</i> sp.	<i>Nostocoida limicola</i> I	0-3	0-4
<i>Nostocoida limicola</i> I ^(MC)				0-4	0-3,5	
<i>Plantomycetes</i>	NLIMIII (301+729+830)	<i>Isosphaera</i> sp.	<i>Nostocoida limicola</i> III	0-5	0-3	
			<i>Nostocoida limicola</i> II, III ^(MC)	2-5	2-5	
TM7			Tipo 0041 ^{(MC)(1)}	0-4	2-3,5	
No afiliadas			CX-02 ^(MC)	-	-	
			CX-03 ^(MC)	-	-	
			Similar a tipo 021N ^(MC)	0-3	0-2	
			Similar a <i>M. parvicella</i> ^(MC)	0-5	-	

(MC) Microscopía convencional. (1) Posible afiliación según Nielsen *et al.* (2009). (2) Posible afiliación según Zornoza *et al.* (2006). (-) No detectado. (*) No se ha realizado la identificación.

Tabla 8.8b. Rango del IF de las bacterias filamentosas identificadas en los biorreactores mediante la técnica FISH y microscopía convencional.

Filo	Sonda FISH	Especificidad	Morfotipo	CXAB	CXCD		
				Rango	Rango		
<i>Proteobacteria</i>	MC2-649	Clase <i>Alphaproteobacteria</i>					
		Ca. 'Monilibacter batavus'	<i>Nostocoida limicola</i> II	0-3	0-5		
	Noli-644	Ca. 'Alysiosphaera europaea'	<i>Nostocoida limicola</i> II	0-1	0-2		
	G123T	Clase <i>Betaproteobacteria</i>					
		Tipo 1701 ^(MC) (1)		0-4	0-4		
		Clase <i>Gammaproteobacteria</i>					
	G2M	<i>Thiothrix</i> sp.		0-1	0-1,5		
	TNI	<i>Thiothrix eikelboomii</i> (Grupo II)	Tipo 021N	0-2,5	0-1		
	TFR	<i>Thiothrix nivea</i>	<i>Thiothrix</i>	0-1	0-1		
	<i>Bacteroidetes</i>	HHY	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	<i>Thiothrix</i>	0-1	0-1	
				<i>Thiothrix</i> (I, II) ^(MC)	-	-	
		CFX197	Tipo 0092 (variante A)	Tipo 1863 ⁽¹⁾	0-2	0-2	
				<i>Beggiatoa</i> sp. ⁽¹⁾	-	0-1	
				<i>H. hydrossis</i>	3-5	4-5	
				<i>H. hydrossis</i> ^(MC)	1-5	0-5	
Tipo 0411 ⁽¹⁾				0-2,5	0-3		
CFX223				Tipo 0092 (variante B)	Tipo 0092	0-2	0-2
Caldi-0678				Género <i>Caldilinea</i>	Tipo 0092 ^(MC)	0-5	0-5
T0803-0654				Tipo 0803 (clase <i>Caldilineae</i>)	Tipo 0803	4-5	4-5
T0803ind-0657	Tipo 0803 (clase <i>Caldilineae</i>)	Tipo 0803	1-5	1-5			
<i>Chloroflexi</i>	CFX67a	Tipo 0914	Tipo 0914	-	-		
			Tipo 0914	-	-		
	CFX67b	Tipo 0914	Tipo 0914	-	-		
			Tipo 0914	-	-		
	AHW183	<i>Nostocoida limicola</i>	<i>Nostocoida limicola</i> II	0-5	0-5		
	<i>Actinobacteria</i>	MPA645	Ca. 'Microthrix parvicella'	Tipo 0803/0914 ^(MC)	1-4	0-4	
				Similar a tipo 1851 ^(MC)	-	-	
		MPA60	Ca. 'Microthrix parvicella'	Tipo 0581 ^(MC) (2)	0-4,5	0-5	
				<i>Microthrix parvicella</i>	0-5	0-5	
		Mpa-all-1410	<i>Microthrix</i>	<i>Microthrix parvicella</i>	0-4	0-5	
Mpa-T1-1260		Ca. 'Microthrix calida'	<i>Microthrix parvicella</i>	1-5	0-5		
			<i>Microthrix parvicella</i> ^(MC)	0-5	0-5		
NLIMIII192		<i>Tetrasphaera japonica</i>	GALO	*	*		
	GALO ^(MC)		0-1	0-2			
	<i>Nostocoida limicola</i> II		0-5	0-5			
<i>Firmicutes</i>	Nlim191	<i>Trichococcus</i> sp.	<i>Nostocoida limicola</i> I	0-5	0-4		
			<i>Nostocoida limicola</i> I ^(MC)	0-4	0-4		
			<i>Nostocoida limicola</i> III	-	0-1		
Plantomycetes	NLIMIII (301+729+830)	<i>Isosphaera</i> sp.	<i>Nostocoida limicola</i> II, III ^(MC)	0-4	0-3,5		
			Tipo 0041 ^(MC) (1)	0-4	0-3,5		
No afiliadas	TM7		CX-02 ^(MC)	0-3,5	0-2		
			CX-03 ^(MC)	0-2	0-2		
			Similar a tipo 021N ^(MC)	0-5	1-5		
			Similar a <i>M. parvicella</i> ^(MC)	-	-		

(MC) Microscopía convencional. (1) Posible afiliación según Nielsen *et al.* (2009). (2) Posible afiliación según Zornoza *et al.* (2006). (-) No detectado. (*) No se ha realizado la identificación.

Tabla 8.8c. Rango del IF de las bacterias filamentosas identificadas en los biorreactores mediante la técnica FISH y microscopía convencional.

Filo	Sonda FISH	Especificidad	Morfotipo	CT1	CT2
				Rango	Rango
<i>Proteobacteria</i>	MC2-649 Noli-644	Clase <i>Alphaproteobacteria</i>			
		<i>Ca. 'Monilibacter batavus'</i>	<i>Nostocoida limicola</i> II	*	*
		<i>Ca. 'Alysiosphaera europaea'</i>	<i>Nostocoida limicola</i> II	*	*
		Clase <i>Betaproteobacteria</i>			
			Tipo 1701 ^(MC) (1)	0-2	0-4
		Clase <i>Gammaproteobacteria</i>			
	G123T	<i>Thiothrix</i> sp.		0-1	0-3
	G2M	<i>Thiothrix eikelboomii</i> (Grupo II)	Tipo 021N	-	-
			Tipo 021N ^(MC)	0-2	0-2
	TNI	<i>Thiothrix nivea</i>	<i>Thiothrix</i>	0-1	0-1
	TFR	<i>Thiothrix fructosivorans</i>	<i>Thiothrix</i>	0-2	0-2
			<i>Thiothrix</i> (I, II) ^(MC)	0-1	0-2
			Tipo 1863 ⁽¹⁾	0-1	0-2
		<i>Beggiatoa</i> sp. ⁽¹⁾	-	-	
<i>Bacteroidetes</i>	HHY	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	<i>H. hydrossis</i>	4-5	0-5
			<i>H. hydrossis</i> ^(MC)	0-5	0-4
			Tipo 0411 ⁽¹⁾	0-1	0-2
<i>Chloroflexi</i>	CFX197	Tipo 0092 (variante A)	Tipo 0092	4-5	4-5
	CFX223	Tipo 0092 (variante B)	Tipo 0092	-	-
			Tipo 0092 ^(MC)	3-5	2,5-4,5
	Caldi-0678	Género <i>Caldilinea</i>		5-5	5-5
	T0803-0654	Tipo 0803 (clase <i>Caldilineae</i>)	Tipo 0803	4-5	3-5
	T0803ind-0657	Tipo 0803 (clase <i>Caldilineae</i>)	Tipo 0803	3-5	3-5
	CFX67a	Tipo 0914	Tipo 0914	0-5	0-5
	CFX67b	Tipo 0914	Tipo 0914	-	-
	AHW183	<i>Nostocoida limicola</i>	<i>Nostocoida limicola</i> II	*	*
			Tipo 0803/0914 ^(MC)	3-4,5	3-4,5
		Similar a tipo 1851 ^(MC)	3,5-5	3-4,5	
		Tipo 0581 ^(MC) (2)	-	-	
<i>Actinobacteria</i>	MPA645	<i>Ca. 'Microthrix parvicella'</i>	<i>Microthrix parvicella</i>	*	*
	MPA60	<i>Ca. 'Microthrix parvicella'</i>	<i>Microthrix parvicella</i>	*	*
	Mpa-all-1410	<i>Microthrix</i>	<i>Microthrix parvicella</i>	*	*
	Mpa-T1-1260	<i>Ca. 'Microthrix calida'</i>	<i>Microthrix parvicella</i>	*	*
			<i>Microthrix parvicella</i> ^(MC)	0-5	0-4
	Gor596	<i>Gordonia</i> sp.	GALO	3-5	4-5
		GALO ^(MC)	3-5	3-5	
<i>Firmicutes</i>	NLIMII192	<i>Tetrasphaera japonica</i>	<i>Nostocoida limicola</i> II	*	*
	NlimI91	<i>Trichococcus</i> sp.	<i>Nostocoida limicola</i> I	*	*
			<i>Nostocoida limicola</i> I ^(MC)	0-5	0-5
<i>Plantomycetes</i>	NLIMIII (301+729+830)	<i>Isosphaera</i> sp.	<i>Nostocoida limicola</i> III	*	*
			<i>Nostocoida limicola</i> II, III ^(MC)	0-3	0-3
TM7			Tipo 0041 ^(MC) (1)	2-4	1-3,5
No afiliadas			CX-02 ^(MC)	-	-
			CX-03 ^(MC)	-	-
			Similar a tipo 021N ^(MC)	0-3,5	0-4
			Similar a <i>M. parvicella</i> ^(MC)	-	-

(MC) Microscopía convencional. (1) Posible afiliación según Nielsen *et al.* (2009). (2) Posible afiliación según Zornoza *et al.* (2006). (-) No detectado. (*) No se ha realizado la identificación.

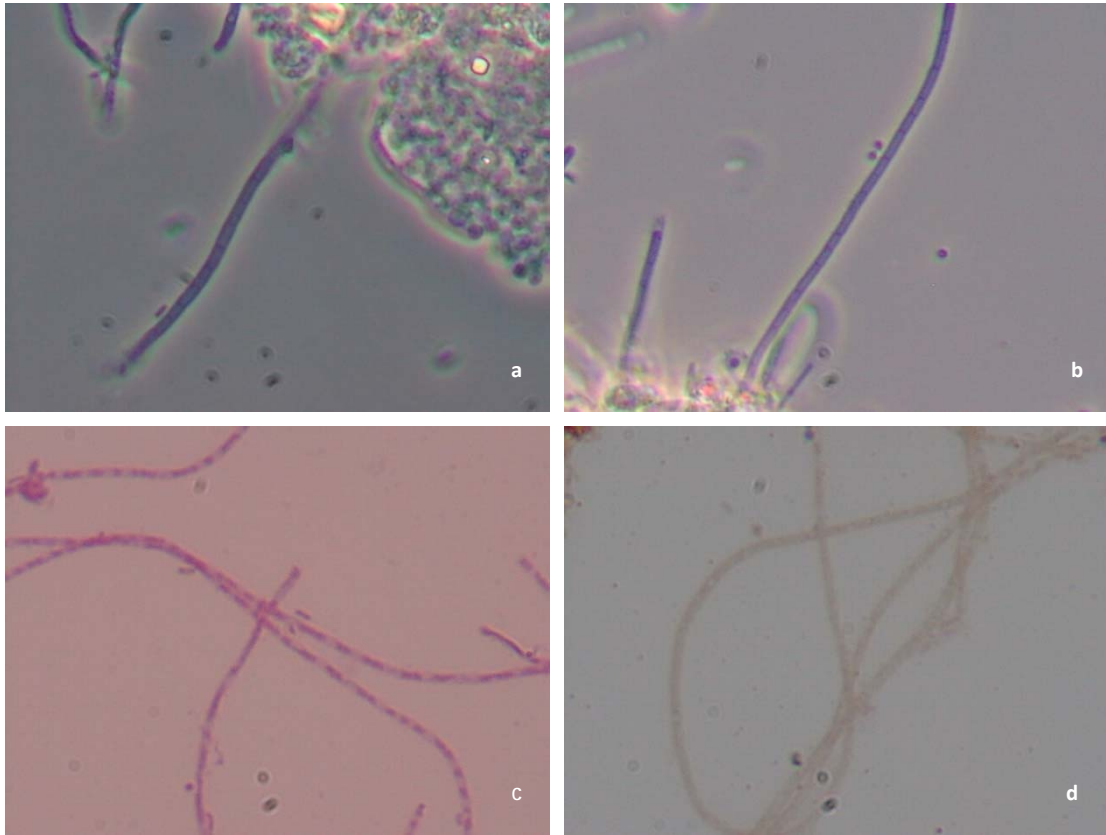


Figura 8.7. Morfortipo 021N*. (a) Contraste de fases, 1000x. (b) Contraste de fases, 1000x. (c) Tinción de Gram. Campo claro, 1000x. (d) Tinción de Neisser. Campo claro, 1000x.

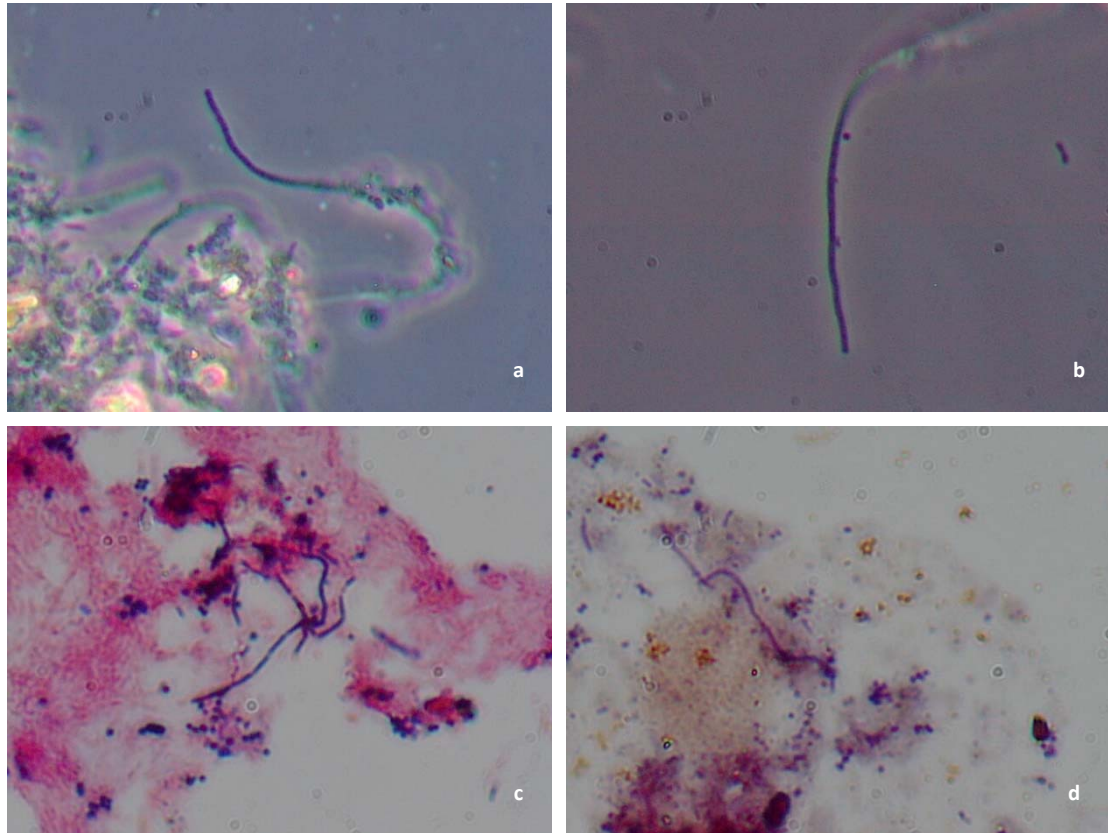


Figura 8.8. Morfotipo *M. parvicella**. (a) Contraste de fases, 1000x. (b) Contraste de fases, 1000x. (c) Tinción de Gram. Campo claro, 1000x. (d) Tinción de Neisser. Campo claro, 1000x.



Figura 8.9. Morfotipo CX-02. (a) Contraste de fases, 1000x. (b) Contraste de fases, 1000x. (c) Tinción de Gram. Campo claro, 1000x. (d) Tinción de Neisser. Campo claro, 1000x.

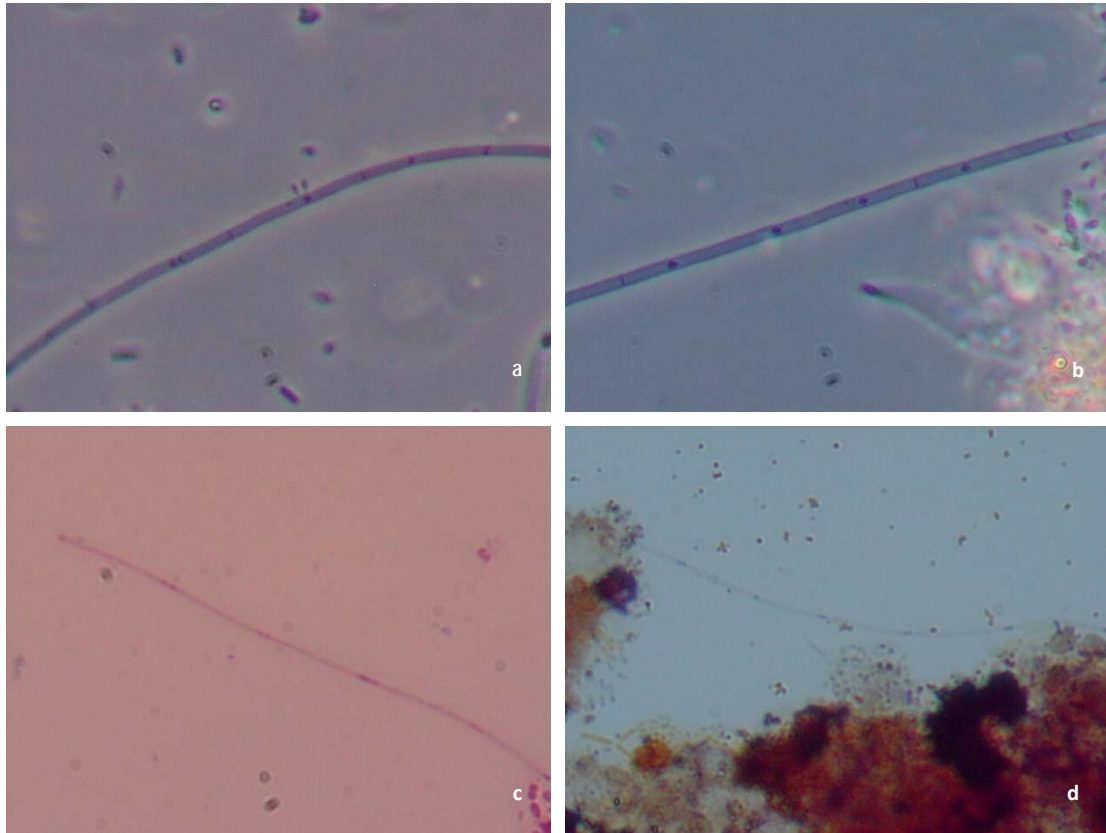


Figura 8.10. Morfotipo CX-03. (a) Contraste de fases, 1000x. (b) Contraste de fases, 1000x. (c) Tinción de Gram. Campo claro, 1000x. (d) Tinción de Neisser. Campo claro, 1000x.

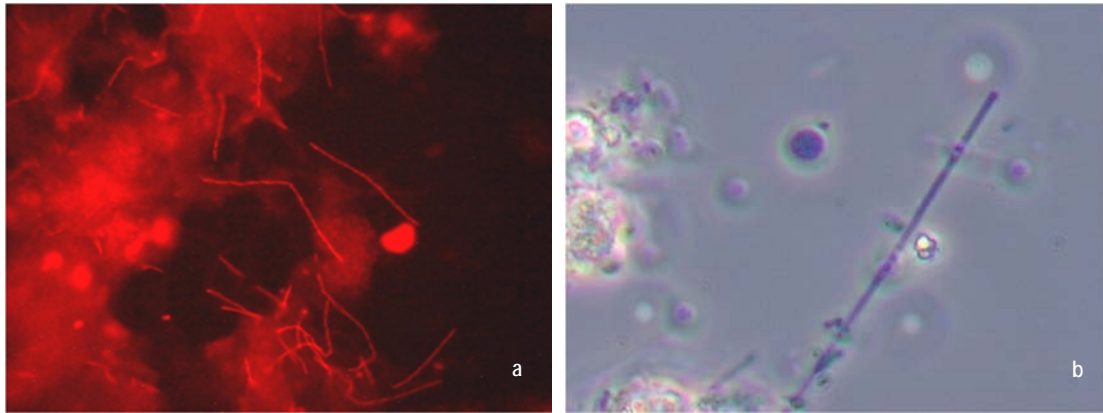


Figura 8.11. Bacterias del morfotipo *Haliscomenobacter hydrossis* hibridando positivamente con sondas 16S rDNA. (a) Señal positiva sonda HHY (*H. hydrossis*). Epifluorescencia, 1000x. (b) Morfotipo *H. hydrossis*. Contraste de fases, 1000x.

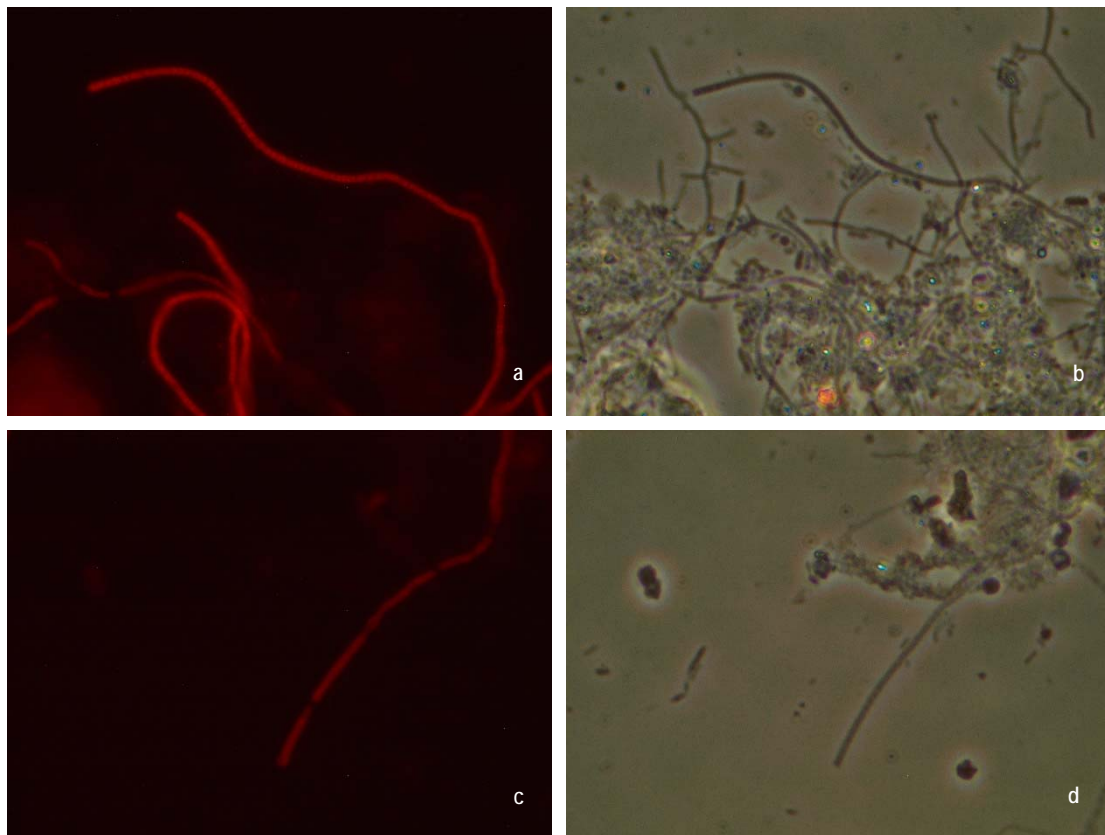


Figura 8.12. Bacterias del morfotipo 0803 hibridando positivamente con sondas 16S rDNA. (a) Señal positiva sonda T0803-0654. Epifluorescencia, 1000x. (b) Mismo campo imagen anterior. Contraste de fases, 1000x. (c) Señal positiva sonda T0803ind-0642. Epifluorescencia, 1000x. (d) Mismo campo imagen anterior. Contraste de fases, 1000x.

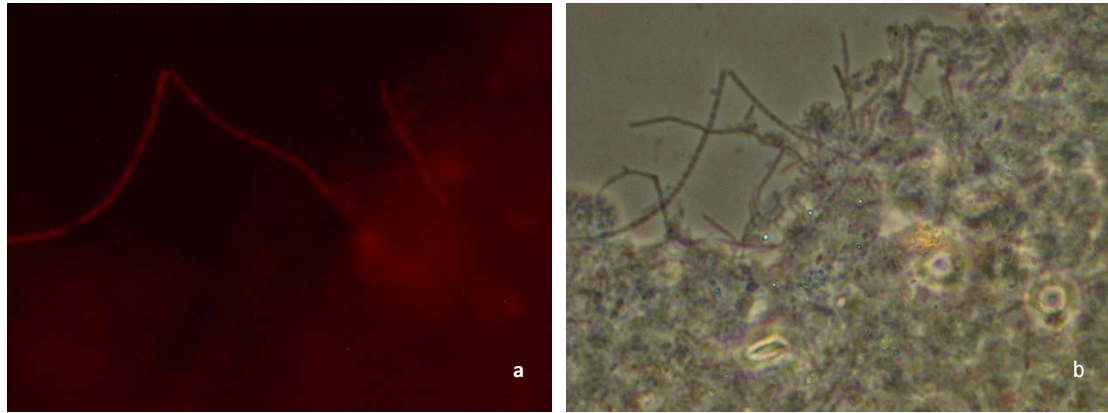


Figura 8.13. Bacterias del morfotipo 0904 hibridando positivamente con sondas 16S rDNA. (a) Señal positiva sonda CFX67a. Epifluorescencia, 1000x. (b) Mismo campo imagen anterior. Contraste de fases, 1000x.

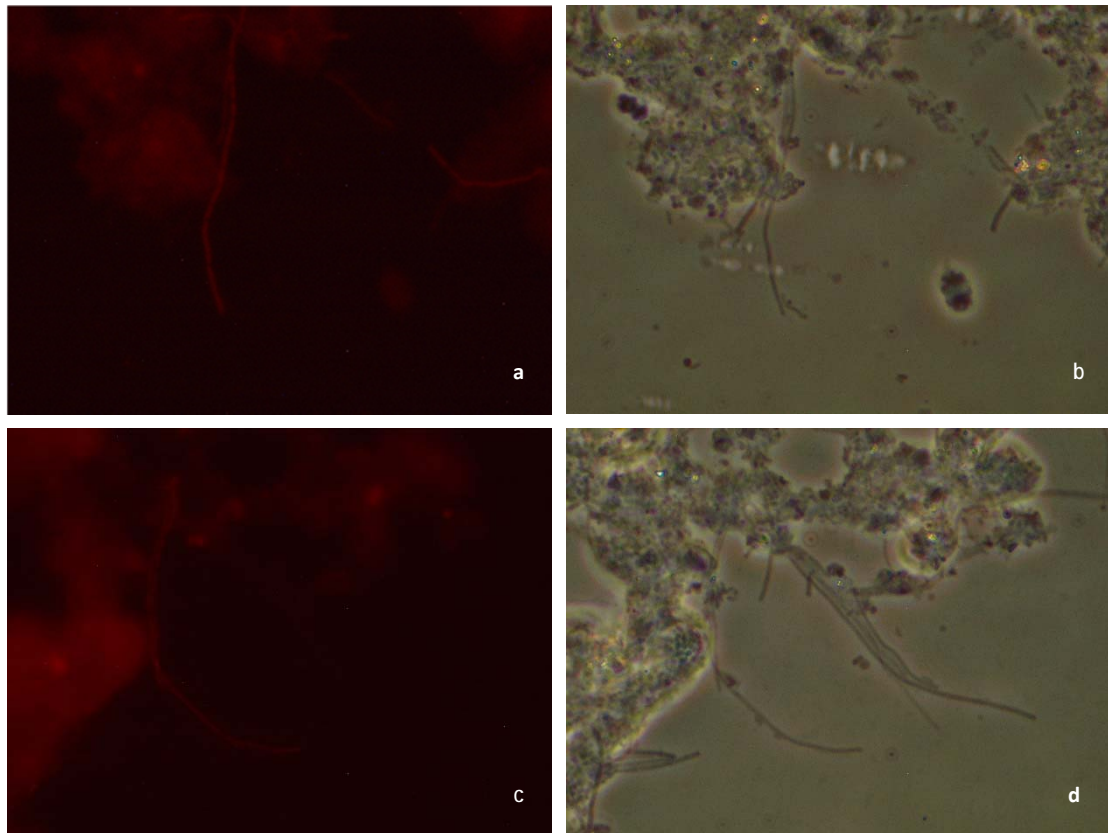


Figura 8.14. Bacterias del morfotipo 0092 hibridando positivamente con sondas 16S rDNA. (a) Señal positiva sonda CFX197. Epifluorescencia, 1000x. (b) Mismo campo imagen anterior. Contraste de fases, 1000x. (c) Señal positiva sonda CFX223. Epifluorescencia, 1000x. (d) Mismo campo imagen anterior. Contraste de fases, 1000x.

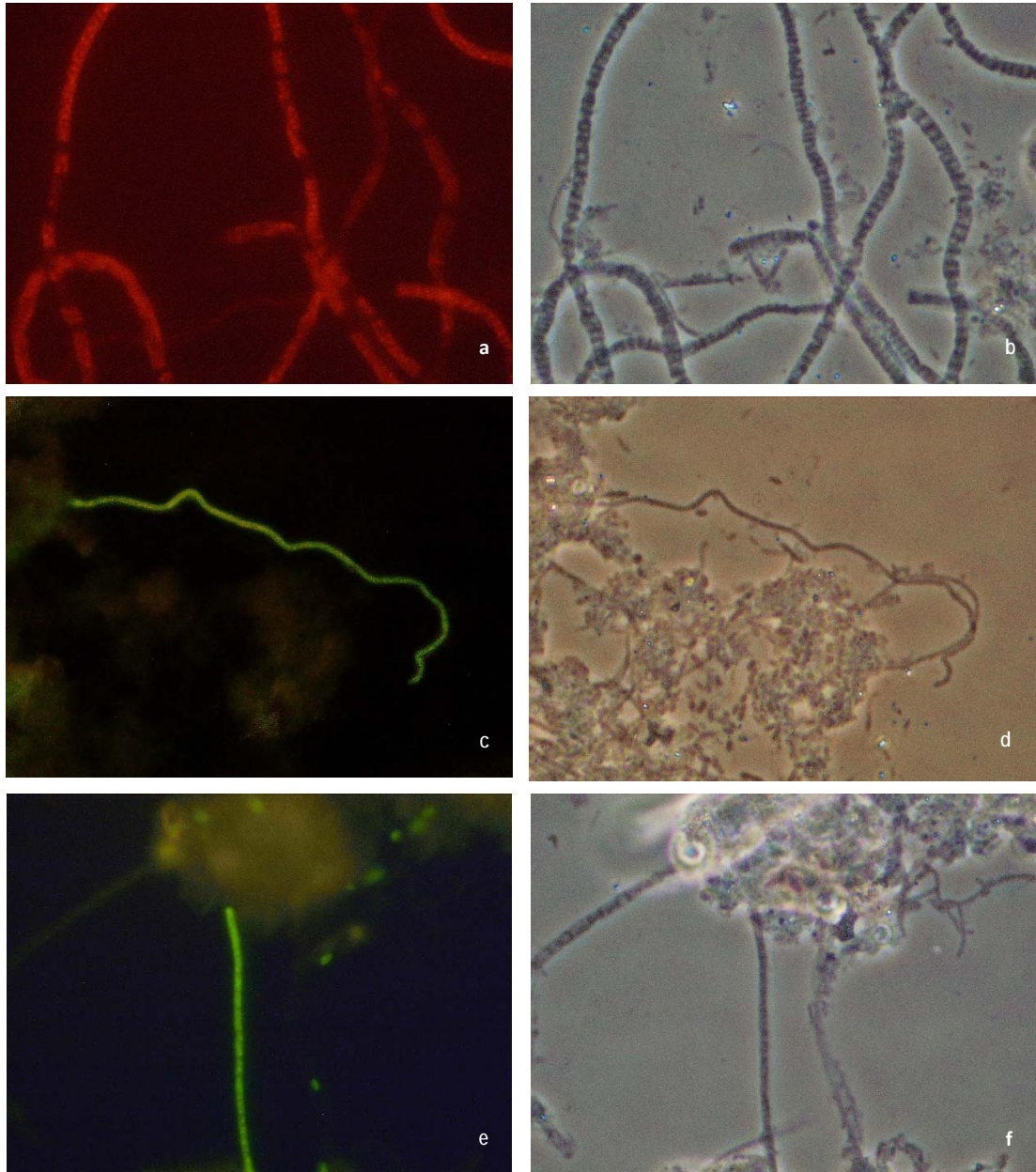


Figura 8.15. Bacterias del género *Thiothrix* hibridando positivamente con sondas 16S rDNA. (a) Señal positiva sonda G2M (*T. eikelboomii*). Epifluorescencia, 1000x. (b) Mismo campo imagen anterior. Contraste de fases, 1000x. (c) Señal positiva sonda TNI (*T. nivea*). Epifluorescencia, 1000x. (d) Mismo campo imagen anterior. Contraste de fases, 1000x. (e) Señal positiva sonda TFR (*T. fructosivorans*). Epifluorescencia, 1000x. (f) Mismo campo imagen anterior. Contraste de fases, 1000x.

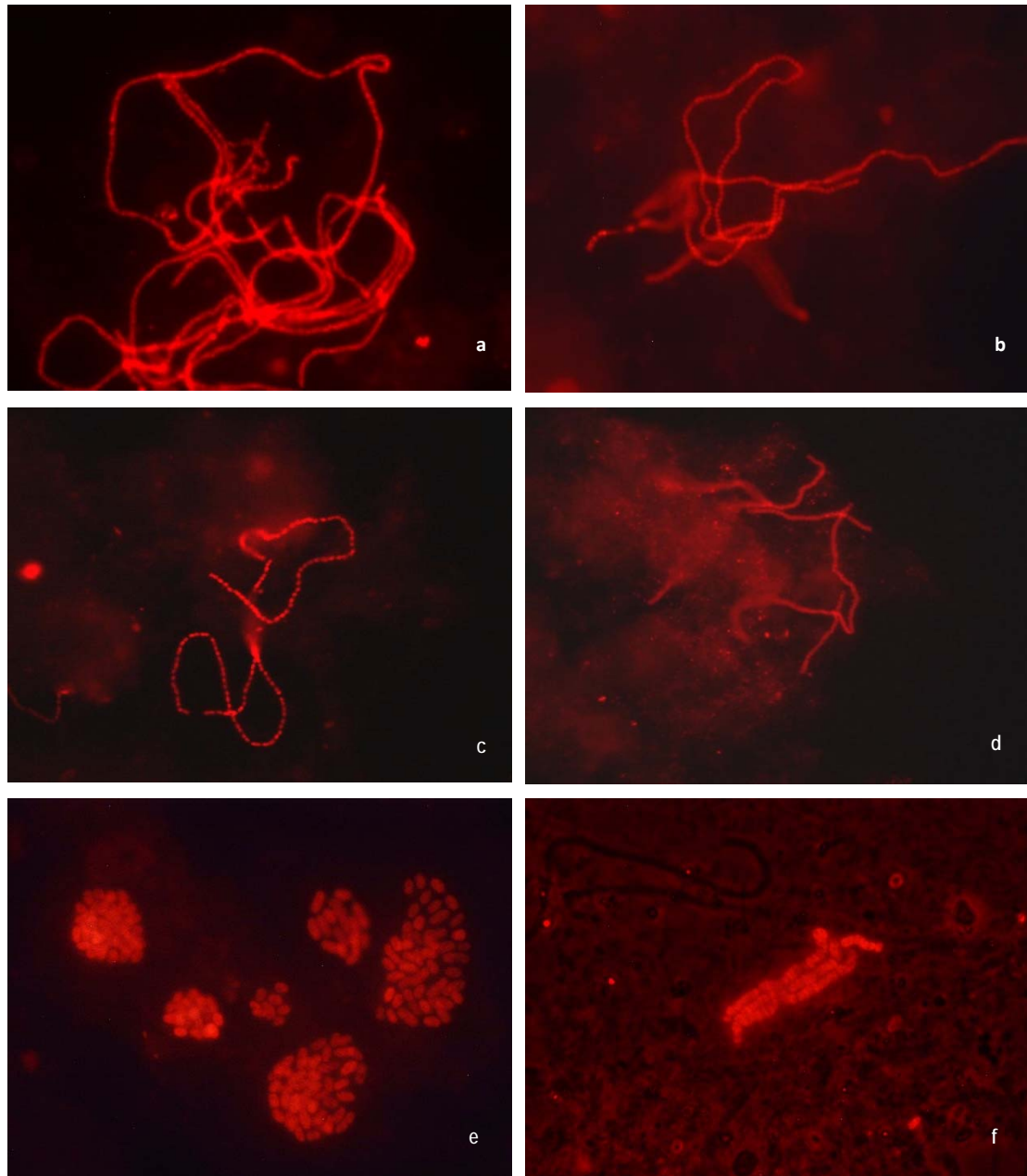


Figura 8.16. Bacterias del morfotipo *Nostocoida limicola* III hibridando positivamente con sondas 16S rDNA. (a) Sonda NLIMIII192 (*Tetrasphaera japonica*). Epifluorescencia, 1000x. (b) Sonda AHW183 (*N. limicola* II filo *Chloroflexi*). Epifluorescencia, 1000x. (c) Sonda Noli-644 (Ca. '*Alysiosphaera europaea*'). Epifluorescencia, 1000x. (d) Sonda MC2-649 (Ca. '*Monilibacter batavus*'). Epifluorescencia, 1000x. (e) Sonda NLIMIII mix, agregados bacterianos de *Isosphaera* sp. Epifluorescencia, 1000x. (f) Sonda NLIMI91 (*Trichococcus* sp.). Epifluorescencia, 1000x.

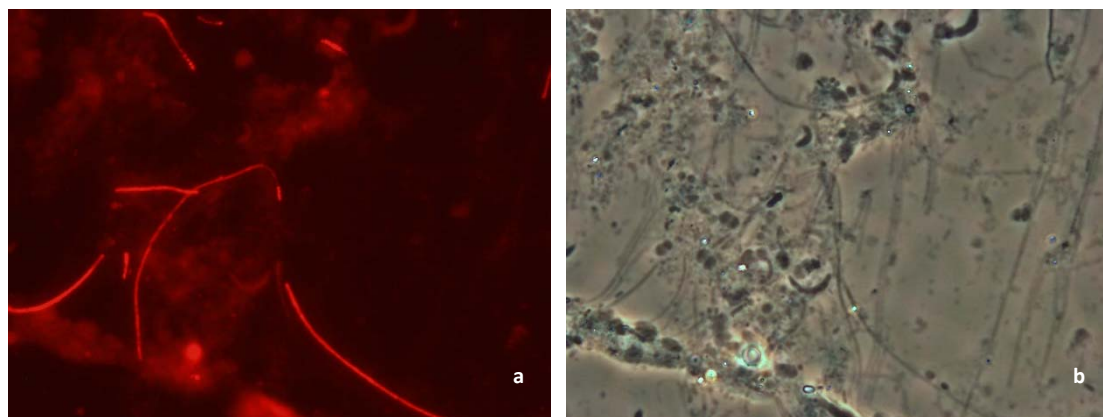


Figura 8.17. Bacterias del morfotipo *M. parvicella* hibridando positivamente con sondas 16S rDNA. (a) Mpa-all-1410 (*Microthrix*). Epifluorescencia, 1000x. (b) Mismo campo imagen anterior. Contraste de fases, 1000x.

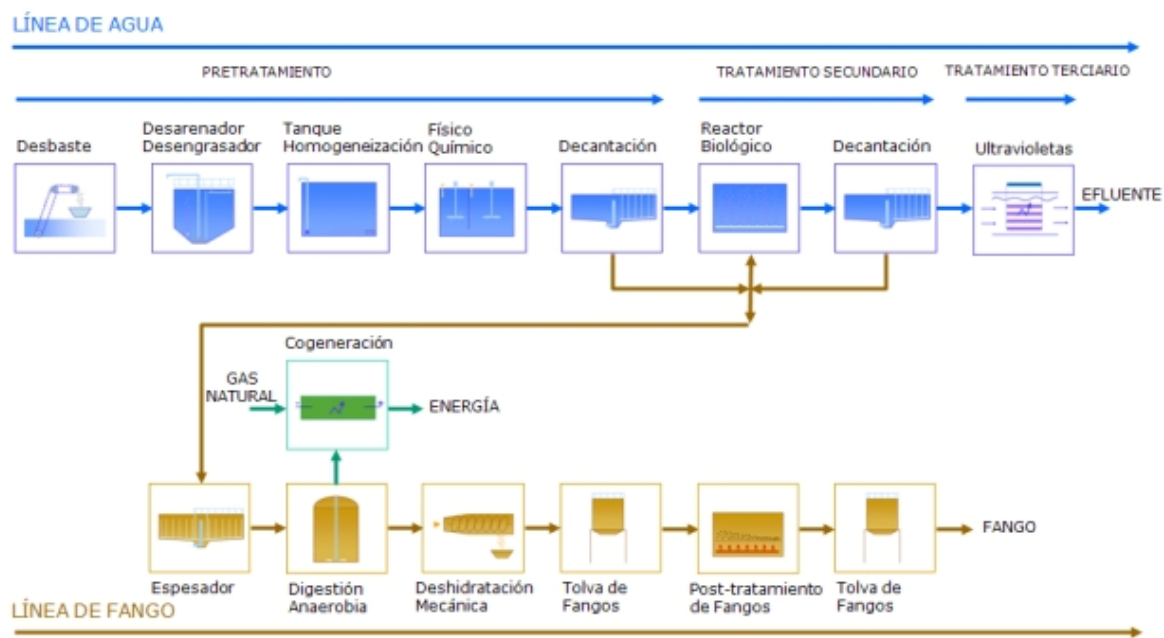


Figura 8.18. Esquema de tratamiento de la EDAR QB.

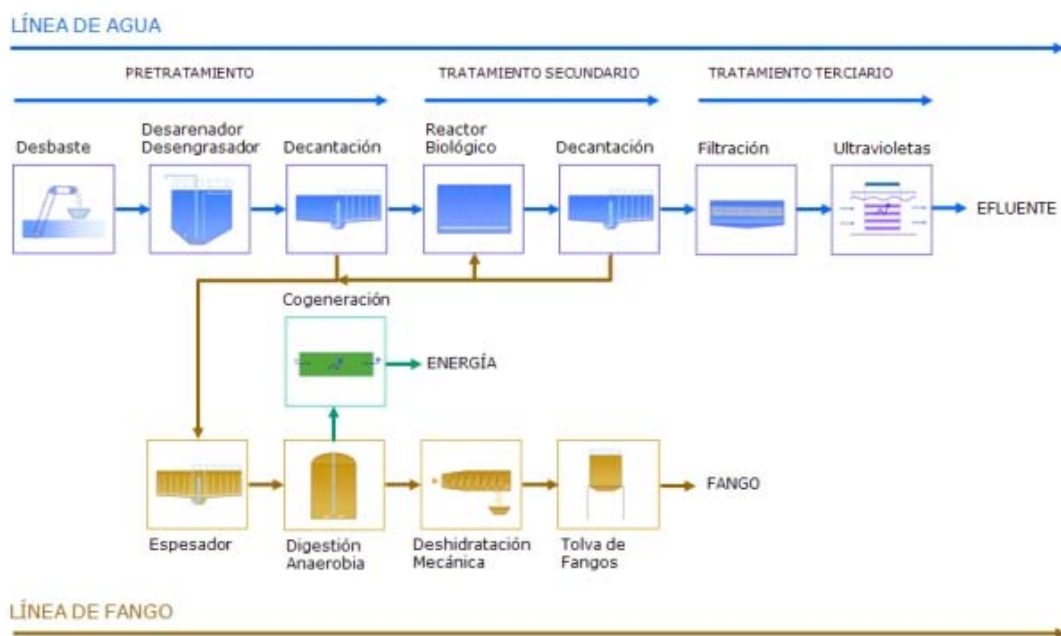


Figura 8.19. Esquema de tratamiento de la EDAR CX.

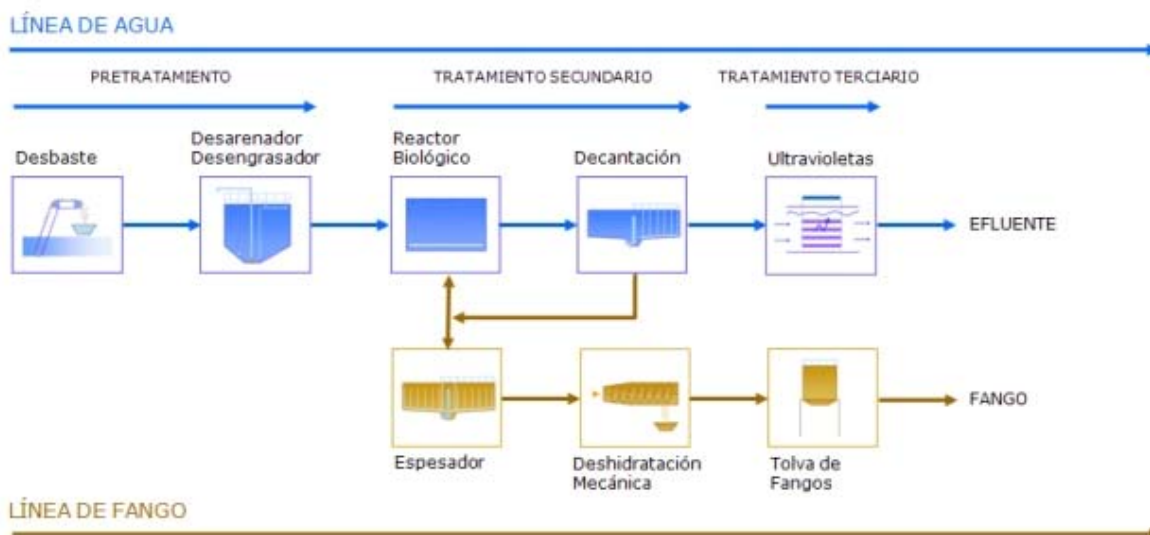


Figura 8.20. Esquema de tratamiento de la EDAR DN.

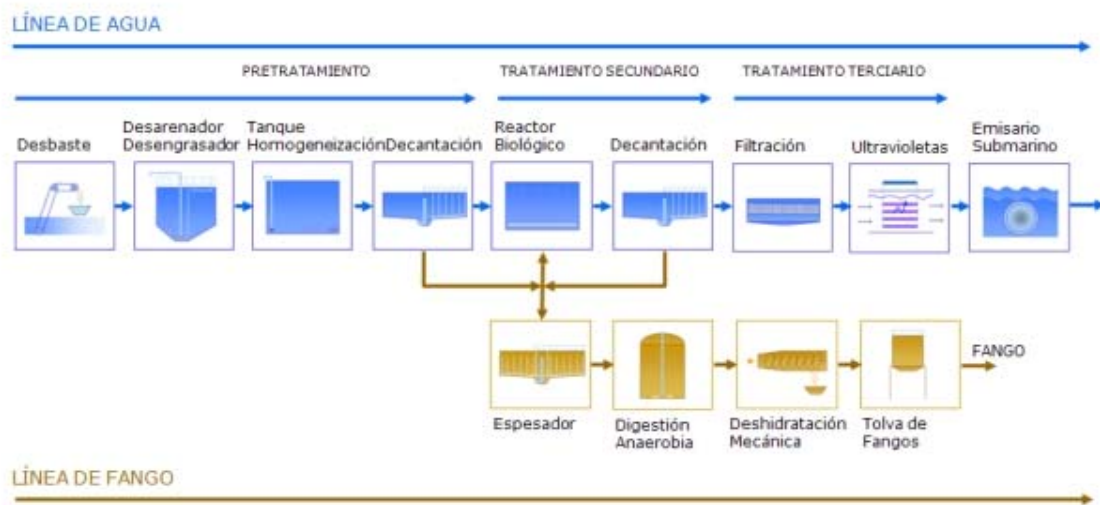


Figura 8.21. Esquema de tratamiento de la EDAR CT.

Tabla 8.9. Densidad absoluta (ind/mL) de protistas y metazoos en los muestreos de los biorreactores QB, CXAB, CXCD, DN, CT1 y CT2.

	QB1	QB2	QB3	QB4	QB5	QB6	QB7	QB8	QB9	QB10	QB11	QB12	QB13	QB14	QB15	QB16	QB17	QB18	QB19	QB20	QB21	QB22	QB23	QB24	QB25
Bodo	0	95000	75000	95000	825000	845000	92217	1000000	115000	70000	35000	360000	60000	30000	15000	10000	65000	70000	85000	25000	130000	10000	65000	15000	610000
Ptrico	100	80	80	80	20	40	0	0	20	0	20	40	160	500	80	640	460	740	1560	540	300	400	300	460	
Entos	0	20	740	640	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	220	360	580	1540	2467	80	200	1200	1520	4800	
Avulg	20	40	120	640	1140	80	60	20	200	560	800	3060	0	20	2260	60	20	0	240	19853	940	0	220	1100	120
Poper	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8600	60	0	0	0	80
Agran	1640	1920	2760	1780	5480	1860	320	760	4920	4700	720	1140	1440	2800	660	1640	760	3020	480	1347	0	2880	760	1940	2580
Apequ	740	1240	1400	1600	1340	1720	12320	1300	3100	2660	13420	3640	680	380	1420	3500	2560	4180	1680	3000	6640	5140	6400	10240	23300
Llame	160	20	60	260	0	0	0	0	60	40	240	0	0	0	120	20	0	60	40	0	0	0	0	0	40
Apunc	0	0	60	540	0	0	60	0	440	80	0	0	240	0	0	1180	220	20	13	0	0	0	0	0	340
Tinfu	0	0	80	0	0	20	20	0	0	80	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	20	20	20	0
Atube	100	40	120	100	80	0	0	0	0	0	747	0	60	60	40	0	20	20	53	20	20	0	20	140	
Periac	60	40	0	40	0	0	0	0	0	20	315	0	0	0	20	20	60	20	27	20	0	20	0	0	
Unigr	240	500	120	1920	120	280	0	5080	20	0	60	0	140	0	0	340	0	1260	320	180	0	0	0	0	
Acica	2180	200	3520	7940	920	660	900	40	2300	8480	480	360	480	1260	100	2160	600	1040	373	1120	400	1460	2120	820	
Eaffi	0	80	2720	0	0	0	0	100	2160	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pfluv	340	0	0	0	0	0	0	0	680	40	480	0	0	40	0	500	140	120	120	40	0	0	0	0	0
Tminu	3080	0	0	1160	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	100	920	20	0	67	360	0	820	2220	140	
Gmemb	0	0	300	0	20	0	0	0	0	0	20	0	160	0	0	40	0	13	20	20	120	1840	0	0	
Aunci	80	1160	700	4180	100	5300	920	0	4160	2060	220	8580	0	1700	80	820	140	820	20	13	500	1180	1520	4860	3880
Oarti	347	87	53	67	380	0	227	27	0	67	133	313	547	140	0	0	0	0	1160	1300	60	13	67	27	
Eplíc	60	540	260	40	400	233	2953	1600	167	1213	0	667	2040	187	627	4813	0	2513	300	1633	0	507	593	247	280
Echry	0	0	0	0	0	0	0	0	40	60	80	180	53	1140	1547	1567	0	0	0	0	0	173	193	0	0
Ebala	720	0	7	3747	300	0	893	1453	227	227	867	100	0	647	3113	4880	0	307	4027	1027	5220	5640	4813	3027	
Vaqua	3000	1580	6900	40	20	180	800	1947	1920	220	20	380	160	4400	500	2080	4040	600	0	93	0	0	0	160	1840
Vconv	460	220	220	0	1300	0	80	147	40	80	120	100	0	180	1440	20	0	0	280	600	0	880	40	60	100
Pseud	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cpoly	7	1687	27	0	0	47	87	0	0	0	0	0	113	433	0	0	0	0	0	0	1647	67	67	113	
Ocoar	0	0	0	0	0	0	0	440	140	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vmicro	700	580	2720	40	0	80	260	773	0	0	0	440	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
Vinfu	0	0	0	0	0	0	0	147	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
Rotar	20	140	60	20	20	0	60	0	40	60	40	120	200	20	100	100	100	120	40	13	160	80	20	0	60
Lecan	240	320	220	460	560	180	80	120	80	340	0	360	320	1800	3520	740	280	340	640	2773	260	460	360	440	620
Nemat	0	0	0	40	100	20	0	0	0	40	0	0	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0	0

	CXAB1	CXAB2	CXAB3	CXAB4	CXAB5	CXAB6	CXAB7	CXAB8	CXAB9	CXAB10	CXAB11	CXAB12	CXAB13	CXAB14	CXAB15	CXAB16	CXAB17	CXAB18	CXAB19	CXAB20	CXAB21	CXAB22	CXAB23	
Bodo	65000	230000	265000	545000	430000	630000	415371	560000	345000	95000	295000	305000	85000	20000	10000	20000	20000	225000	75000	105000	55000	10000	160000	
Ptrico	0	20	0	0	0	100	0	60	60	0	1220	1800	760	160	340	680	300	980	200	1960	360	840	660	
Entos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	160	280	600	160	2560	720	1600	360	0	560	38420	1220	20	
Avulg	40	0	0	0	0	0	140	0	20	1100	2020	180	1540	3360	20	3300	1280	20	160	80	0	220	340	
Poper	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4280	0	180	700	6780	180	0	20	0	0	
Agran	0	20	20	60	260	1240	280	260	1160	3520	460	1160	720	400	600	700	180	120	0	500	280	700	660	
Apequ	920	500	460	1520	1700	5480	12660	2400	820	8560	13420	3620	1800	1960	4200	2380	17540	500	1160	6840	1460	7080	7540	
Llame	0	0	100	0	40	380	200	0	120	880	140	60	40	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Apunc	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	320	60	0	0	140	0	0	0	40	0	40	0	0	0
Tinfu	20	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	60	20	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0
Atube	0	0	0	0	0	0	0	0	0	140	360	140	620	160	40	160	600	0	60	440	60	80	20	
Periac	0	0	0	0	0	0	0	0	0	140	160	120	40	0	200	20	120	180	320	80	0	0	0	
Unigr	20	40	20	0	60	0	20	20	560	120	100	660	80	40	60	0	160	160	260	40	460	20	0	
Acica	5840	2540	2440	160	1560	480	220	360	660	80	0	580	620	780	340	860	340	360	2700	2220	3180	1680	500	
Eaffi	20	20	80	1300	80	220	0	140	160	0	20	0	0	0	0	0	0	480	60	0	0	0	0	
Pfluv	0	0	0	0	0	20	100	0	860	0	740	460	60	100	160	160	0	0	0	0	140	20	0	
Tminu	60	140	400	0	300	300	380	240	640	0	1760	620	40	0	60	20	0	0	0	0	100	40	60	
Gmemb	0	0	0	0	20	20	0	0	260	180	240	140	160	0	140	760	0	0	0	20	0	20	0	40
Aunci	1980	320	1100	100	2280	60	320	1840	5360	120	880	1800	40	1420	4600	2840	3300	6740	0	200	100	760	0	
Oarti	0	0	0	0	0	0	0	0	0	53	570	80	113	367	133	67	100	0	0	927	67	0	0	0
Eplíc	0	0	0	0	0	0	0	167	380	173	170	887	1787	213	720	2207	60	2100	0	2280	2120	1587	0	0
Echry	13	160	173	107	20	0	0	0	0	500	0	0	0	0	0	20	0	0	33	13	0	0	0	0
Ebala	0	0	0	0	0	140	180	940	233	0	180	0	393	267	467	753	0	647	120	1160	473	127	0	
Vaqua	2160	4920	1840	900	860	140	1340	2680	300	700	520	1060	2480	100	1020	580	500	180	1840	380	120	60	0	0
Vconv	1160	1400	1980	3340	600	0	340	80	0	840	20	100	20	0	60	0	20	40	60	0	160	140	0	0
Pseud	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cpoly	33	60	87	0	340	0	40	0	20	40	193	640	1680	0	0	0	213	53	127	247	0	113	0	0
Ocoar	340	920	640	1220	433	0	20	0	120	320	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vmicro	40	60	200	160	20	80	100	60	0	120	100	0	140	0	0	20	0	40	100	1100	160	100	20	0
Vinfu	0	0	0	0	1180	180	1140	240	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	40	20	0	0	0
Rotar	0																							

	CT1-1	CT1-2	CT1-3	CT1-4	CT1-5	CT1-6	CT1-7	CT1-8	CT1-9	CT1-10	CT1-11	CT1-12	CT1-13	CT1-14	CT1-15	CT1-16	CT1-17	CT1-18	CT1-19	CT1-20	CT1-21	CT1-22	CT1-23
Bodo	65161	30000	15000	35000	65000	120000	564880	275000	95000	5000	10000	140000	80000	35000	65000	15000	20000	15000	50000	95000	70000	130000	225000
Ptrico	0	0	0	0	0	0	0	0	40	20	0	0	0	0	0	20	0	60	120	140	222	20	40
Entos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Avulg	1300	2080	2120	320	60	20	20	0	0	0	0	0	0	20	20	3180	6040	6420	7260	7880	16419	840	2420
Poper	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40
Agran	0	0	40	20	20	0	0	0	40	0	0	40	40	0	20	20	0	0	40	20	15	280	60
Apequ	20	80	120	120	260	9840	5820	460	1100	180	120	120	440	420	600	320	1180	360	460	480	770	8740	14260
Llame	20	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
Apunc	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	20
Tinfu	0	0	0	20	160	820	60	80	40	180	440	80	0	0	20	20	20	20	0	20	15	0	0
Atube	0	0	0	0	0	0	0	20	140	60	0	0	80	80	20	0	20	240	100	0	44	0	100
Periac	0	0	20	0	0	0	0	100	0	0	0	40	0	0	0	0	0	0	40	40	0	60	0
Unigr	100	20	80	320	40	100	120	80	160	260	0	0	0	0	0	100	0	60	60	104	300	0	
Acica	3320	9020	17880	25240	18780	1180	1960	1940	15880	12560	2560	1320	1400	480	840	920	1300	1280	440	1420	2754	760	1740
Eaffi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pfluv	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	80	260	40	0	0	140	0	0
Tminu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1510	0	200
Gmemb	400	20	0	0	80	20	120	120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	220	7	140	30	0	0
Aunci	160	20	0	0	0	0	20	0	140	40	0	40	1440	600	580	840	580	500	3000	1740	1880	1920	4820
Oarti	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	53	167	600	1427	370	47	27	0
Epluc	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	67	0
Echry	0	0	13	40	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	40	47	27	173	0	0	0	0	53
Ebala	0	0	0	107	0	0	0	140	0	0	0	200	0	0	160	0	33	0	20	0	1140	0	0
Vaqua	2360	260	2160	360	2960	200	2820	400	580	700	1200	160	800	260	540	1100	500	420	240	200	178	20	860
Vconv	120	120	0	20	0	20	40	0	20	0	0	0	0	20	0	0	40	0	120	20	15	140	260
Pseud	0	0	0	20	60	20	0	0	0	40	320	40	0	0	0	20	120	160	0	0	20	0	0
Cpoly	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	60	0	47	0	5	7	40	0
Ocoar	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	193	60	0
Vmicro	80	40	260	0	0	20	0	0	20	380	0	0	80	0	0	220	220	140	100	222	560	1240	0
Vinfu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	160	0	0	0	0	0	0	60	148	840	200
Rotar	40	20	0	0	0	0	0	20	20	0	0	0	0	20	0	20	0	0	20	30	20	60	0
Lecan	140	40	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	20	20	15	20	60	0
Nemat	0	20	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	20	0	20	40

	CT2-1	CT2-2	CT2-3	CT2-4	CT2-5	CT2-6	CT2-7	CT2-8	CT2-9	CT2-10	CT2-11	CT2-12	CT2-13	CT2-14	CT2-15	CT2-16	CT2-17	CT2-18	CT2-19	CT2-20	CT2-21	CT2-22	CT2-23
Bodo	82527	165000	5000	80000	175000	145000	455080	250000	75000	60000	85000	70000	140000	95000	60000	40000	0	45000	100000	360000	95000	155000	980000
Ptrico	0	21	55	0	67	130	162	14	104	14	516	242	96	69	448	0	0	26	244	137	81	83	0
Entos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	55	0	0	0
Avulg	180	859	625	181	135	81	11	14	0	0	0	0	1803	10308	12314	9181	5499	8302	2413	3695	807	533	0
Poper	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	0	0	0	0	62	485
Agran	380	1173	1158	272	370	130	54	1068	621	163	172	121	24	104	60	21	584	291	310	302	646	207	81
Apequ	120	7664	147	136	370	2466	8615	13153	1605	5438	1118	1819	2080	433	1434	21	13957	978	37724	4169	2524	9938	67668
Llame	20	21	18	0	0	0	0	0	52	0	201	61	24	17	60	0	0	0	55	40	0	65	0
Apunc	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	277	0	0	133	53	0	0	1010	21	145
Tinfu	0	0	0	0	32	22	41	0	0	0	61	48	17	60	0	0	26	0	82	0	0	0	0
Atube	0	0	0	0	0	0	0	26	0	0	212	167	0	60	43	0	106	0	27	81	41	16	0
Periac	0	0	18	0	17	0	0	52	0	0	0	24	0	30	21	27	0	55	0	83	81	0	0
Unigr	60	168	386	514	151	130	11	0	136	0	0	0	0	0	451	0	740	0	2359	20	207	16	0
Acica	60	796	10639	11025	7905	5646	2918	602	0	1790	3381	2243	2797	555	627	0	769	7376	0	2441	2948	704	921
Eaffi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pfluv	0	0	0	60	17	0	11	0	52	285	29	91	789	104	418	0	80	582	0	0	0	0	32
Tminu	0	0	0	30	0	0	0	0	0	229	182	0	69	0	0	0	0	0	0	0	62	162	0
Gmemb	60	0	459	907	118	97	324	27	0	0	0	30	0	0	64	0	185	0	0	222	0	0	0
Aunci	60	3916	331	91	336	2044	454	9184	1889	976	3267	1637	2892	763	1703	0	478	952	4937	1673	1434	1449	4071
Oarti	267	2778	172	0	0	0	0	0	131	0	0	24	87	687	0	1141	1930	2081	27	135	166	129	0
Epluc	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	283	0	0
Echry	33	0	0	10	0	0	0	146	0	181	0	0	0	69	657	0	0	0	0	0	0	0	226
Ebala	0	181	496	76	673	3169	371	46	449	181	0	667	96	1179	40	7	71	176	0	0	646	3920	1066
Vaqua	1160	84	496	423	443	1931	1286	479	1967	773	688	4122	191	3103	1315	5437	3370	238	620	549	101	62	210
Vconv	20	0	1341	15	17	487	173	424	52	366	0	91	0	0	0	43	159	26	199	0	20	62	32
Pseud	0	0	0	4189	1732	97	65	0	1941	936	258	424	0	0	0	64	106	53	0	0	0	0	0
Cpoly	40	0	25	40	50	260	378	55	543	741	544	0	0	0	0	0	27	0	0	0	0	0	0
Ocoar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	248	16	0
Vmicro	1680	607	4043	60	0	114	22	14	52	0	0	61	48	0	0	0	716	0	89	795	1918	828	775
Vinfu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	247	283	455	194
Rotar	40	21	37	15	0	16	11	14	207	108	0	15	36	87	179	107	106	53	199	27	81	0	0
Lecan	60	63	0	15	0	0	0	0	0	14	29	0	0	104	0	129	106	0	66	110	0	21	48
Nemat	0	0	0	0	17	0	0	41	0	0	0	0	0	0	0	0	26	0	82	40	21	16	0

Tabla 8.10. Densidad absoluta (ind/mL) de los grupos de protistas y metazoos en los muestreos de los biorreactores QB, CXAB, CXCD, DN, CT1 y CT2.

	QB1	QB2	QB3	QB4	QB5	QB6	QB7	QB8	QB9	QB10	QB11	QB12	QB13	QB14	QB15	QB16	QB17	QB18	QB19	QB20	QB21	QB22	QB23	QB24	QB25
Pflag	0	95000	75000	95000	825000	845000	92217	1000000	115000	70000	35000	360000	60000	30000	15000	10000	65000	70000	85000	25000	130000	10000	65000	15000	610000
Gflag	100	100	820	720	220	40	0	0	20	0	20	40	160	500	80	300	1000	1040	2280	4027	620	500	1600	1820	5260
Atest	20	60	120	640	1140	80	60	20	200	560	800	3060	0	20	2860	60	40	120	260	28533	1040	0	440	1600	2300
Adesn	2380	3160	4160	3380	6820	3580	12640	2060	8020	7360	14140	4780	2120	3180	2080	5140	3320	7200	2160	4347	6640	8020	7160	12180	25880
Ameb	2400	3220	4280	4020	7960	3660	12700	2080	8220	7920	14940	7840	2120	3200	4940	5200	3360	7320	2420	32880	7680	8020	7600	13780	28180
Rotif	260	460	280	480	580	180	140	120	120	400	40	480	520	1820	3620	840	380	460	680	2787	440	540	380	440	680
Nema	0	0	0	40	100	20	0	0	0	40	0	0	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0	0
Gastr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	160	160	120	0	100	120	20	20	0
Aneli	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	20	560	0	0	0	0	0	20	20	0	0	20
Metaz	280	460	280	520	680	200	140	120	120	440	40	480	620	1840	4200	840	540	620	800	2787	560	680	440	460	700
Hetero	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hipotr	2180	280	6240	7940	920	660	900	140	4460	8480	480	360	480	480	1260	100	2160	600	1040	373	1120	400	1460	2120	820
Esticotr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	100	20	0	0	0
Pleuro	240	1180	820	4980	100	5300	980	0	4600	2200	260	8820	0	1940	80	940	1340	1040	100	67	500	1180	1520	4860	4260
Filof	3420	0	300	1160	20	0	0	0	0	680	40	500	0	160	100	100	1420	200	120	200	420	20	940	4060	140
Suctor	220	140	200	220	120	120	20	0	300	180	60	1101	0	100	60	80	20	80	100	107	60	60	67	73	140
Penic	0	0	0	0	20	40	60	0	0	0	20	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Escuti	240	500	120	1920	120	280	0	0	5080	20	0	0	0	60	0	140	0	1720	920	0	1260	320	180	0	0
Peritr	5293	4693	10187	3933	2400	540	5300	6533	2533	1867	1220	1740	3240	6847	7660	13360	4040	3120	887	7513	2327	8487	6547	5413	5427
Prorod	0	0	60	540	0	0	60	0	440	80	0	0	0	240	0	0	1180	300	40	13	20	40	93	140	40

	CXAB1	CXAB2	CXAB3	CXAB4	CXAB5	CXAB6	CXAB7	CXAB8	CXAB9	CXAB10	CXAB11	CXAB12	CXAB13	CXAB14	CXAB15	CXAB16	CXAB17	CXAB18	CXAB19	CXAB20	CXAB21	CXAB22	CXAB23
Pflag	65000	230000	265000	545000	430000	630000	415371	560000	345000	95000	295000	305000	85000	20000	10000	20000	20000	225000	75000	105000	55000	10000	160000
Gflag	0	20	0	0	0	100	0	60	60	20	1380	2080	1360	320	2900	1400	1900	1340	200	2520	38780	2060	680
Atest	40	0	0	0	0	140	0	20	1100	2020	180	1540	7640	20	3480	1980	6800	361	80	60	300	380	
Adesn	920	520	480	1580	1960	6720	12940	2660	1980	12080	13880	4780	2520	2360	4800	3080	17720	620	1160	7340	1740	7780	8200
Ameb	960	520	480	1580	1960	6720	13080	2660	2000	13180	15900	4960	4060	10000	4820	6560	19700	7420	1521	7420	1800	8080	8580
Rotif	0	40	0	20	0	60	100	20	40	1180	140	340	600	1300	1180	780	1020	580	1350	680	1880	2320	1580
Nema	40	40	60	40	0	20	0	0	20	0	0	40	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0
Gastr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	20	0	0	0	40	20	
Aneli	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	7	13	0	20	0	0	
Metaz	40	80	60	60	0	80	100	20	60	1180	140	380	600	1300	1187	820	1040	587	1363	700	1900	2360	1600
Hetero	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hipotr	5860	2560	2520	1460	1640	700	220	500	820	80	20	580	620	780	340	860	340	360	3180	2280	3180	1680	500
Esticotr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pleuro	1980	320	1200	100	2320	440	200	320	1960	6240	260	1260	1900	140	1420	4740	2840	3300	6740	40	200	100	760
Filof	60	140	400	0	380	700	500	240	1760	260	180	2740	1220	260	100	360	940	0	0	20	240	120	
Suctor	20	0	0	0	60	0	40	0	40	180	500	500	760	200	40	400	620	60	260	780	387	180	20
Penic	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Escuti	20	40	20	0	60	0	20	20	560	120	100	660	80	40	60	0	160	160	260	40	460	20	0
Peritr	3767	7520	4920	5787	3493	520	3060	3300	1447	2473	1727	2313	4247	4073	1927	2360	3647	953	3200	3260	5347	3020	1907
Prorod	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21	179	7	20	0	0	240	260

	CXCD1	CXCD2	CXCD3	CXCD4	CXCD5	CXCD6	CXCD7	CXCD8	CXCD9	CXCD10	CXCD11	CXCD12	CXCD13	CXCD14	CXCD15	CXCD16	CXCD17	CXCD18	CXCD19	CXCD20	CXCD21	CXCD22	CXCD23
Pflag	185000	170000	190000	355000	1255000	125000	0	635000	910000	90000	480000	355000	75000	125000	40000	0	10000	225000	145000	95000	605000	130000	10000
Gflag	20	20	0	0	0	0	0	0	20	560	3580	3426	1440	2340	240	920	760	3640	260	1900	25140	920	540
Atest	100	100	0	0	0	0	40	0	160	1220	60	400	5880	1020	2300	2999	961	1361	1060	161	60	40	
Adesn	440	480	180	640	1200	3960	672	1920	1560	3500	13680	9959	1860	3200	540	1980	2420	940	880	7180	2800	9280	2620
Ameb	540	580	180	640	1200	3960	712	1920	1560	3660	14900	10019	2260	9080	1560	4280	5419	1901	2241	8240	2961	9340	2660
Rotif	20	40	0	0	20	0	0	120	520	360	317	560	480	700	100	560	800	990	540	520	900	1000	
Nema	0	40	20	0	0	0	0	0	20	20	20	60	0	20	20	20	0	0	40	20	0	0	
Gastr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	0	0	0	0	0	
Aneli	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Metaz	20	80	20	0	20	0	0	120	540	100	337	620	480	720	120	600	820	990	580	540	900	1000	
Hetero	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Hipotr	4160	4300	10420	6200	620	840	2084	940	700	400	1180	680	1440	1280	580	240	2460	1200	1220	2460	1520	4760	4480
Esticotr	0	0	0	0	0																		

	DN1	DN2	DN3	DN4	DN5	DN6	DN7	DN8	DN9	DN10	DN11	DN12	DN13	DN14	DN15	DN16	DN17	DN18	DN19	DN20	DN21	DN22	DN23
Pflag	85000	345000	220000	10000	40000	65000	100619	306447	445000	270000	45000	75000	25000	35000	15000	15000	85000	60000	55000	45000	40000	60000	65000
Gflag	160	400	240	1200	360	940	1480	1020	560	1800	360	320	500	320	340	100	1040	340	120	160	300	260	640
Atest	2380	2660	940	280	320	200	380	380	760	1040	2380	1280	360	480	1460	2020	540	460	1260	2300	3360	2680	3480
Adesn	80	240	720	6120	8960	3240	2860	4800	4960	5620	1740	2080	1920	19520	4900	3660	340	640	1080	6580	3040	1540	2520
Ameb	2460	2900	1660	6400	9280	3440	3240	5180	5720	6660	4120	3360	2280	20000	6360	5680	880	1100	2340	8880	6400	4220	6000
Rotif	80	60	80	80	100	200	80	80	140	200	120	80	60	80	140	100	820	440	220	300	600	380	240
Nema	0	40	0	0	0	20	0	0	60	60	20	40	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
Gastr	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aneli	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Metaz	80	120	80	80	100	220	80	80	200	260	140	120	80	80	140	100	820	440	220	300	600	380	260
Hetero	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hipotr	780	900	580	340	240	440	680	240	0	460	440	2000	660	480	260	100	540	1100	780	920	700	1220	840
Esticotr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pleuro	360	80	1000	1660	1520	6740	1280	2060	1200	400	2000	1040	120	240	1240	300	20	2060	1120	740	520	1340	1460
Filof	1700	1340	1920	1780	2180	8320	2860	400	180	4420	680	5640	660	440	2180	1700	80	20	140	3260	460	2640	4720
Suctor	180	260	280	260	0	240	180	0	20	80	120	440	240	200	260	180	120	100	100	280	360	240	300
Penic	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Escuti	120	40	20	0	0	180	40	0	0	0	0	120	80	100	280	80	0	100	100	1080	340	40	160
Peritr	633	640	3020	3253	760	1807	1600	20	2880	1980	680	240	1327	2353	747	1787	1307	647	887	1220	1580	880	1693
Prorod	0	0	0	20	20	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	80	100	160	140

	CT1-1	CT1-2	CT1-3	CT1-4	CT1-5	CT1-6	CT1-7	CT1-8	CT1-9	CT1-10	CT1-11	CT1-12	CT1-13	CT1-14	CT1-15	CT1-16	CT1-17	CT1-18	CT1-19	CT1-20	CT1-21	CT1-22	CT1-23
Pflag	65161	30000	15000	35000	65000	120000	564880	275000	95000	5000	10000	140000	80000	35000	65000	15000	20000	15000	50000	95000	70000	130000	225000
Gflag	0	0	0	0	0	0	0	0	40	20	0	0	0	0	0	20	0	60	120	140	222	20	40
Atest	1300	2080	2120	320	60	20	20	0	0	0	0	0	0	20	20	3180	6040	6420	7260	7880	16419	880	2420
Adesn	20	80	160	140	280	9840	5820	460	1140	180	120	160	480	420	620	340	1180	360	500	500	785	9020	14320
Ameb	1320	2160	2280	460	340	9860	5840	460	1140	180	120	160	480	440	640	3520	7220	6780	7760	8380	17204	9900	16740
Rotif	180	60	0	0	0	0	20	0	20	20	0	0	0	0	20	0	20	60	20	40	44	40	120
Nema	0	20	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	20	0	20	40
Gastr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	20	0	0	20	15	0	80
Aneli	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Metaz	180	80	0	0	0	0	20	0	40	20	0	0	0	0	60	20	40	60	20	80	59	60	240
Hetero	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hipotr	3320	9020	17880	25240	18780	1180	1960	1940	15880	12560	2560	1320	1440	480	840	920	1300	1280	440	1420	2754	760	1740
Esticotr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pleuro	180	20	0	0	0	0	20	0	140	60	0	40	1440	600	580	840	580	500	3000	1740	1880	1960	4860
Filof	400	20	0	0	80	20	120	120	0	0	0	0	0	0	0	40	80	480	47	140	1540	140	200
Suctor	0	0	20	20	160	820	60	100	280	240	440	120	80	80	20	20	40	260	140	60	59	80	100
Penic	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Escuti	100	20	80	320	40	100	120	80	160	260	0	0	0	0	0	0	100	0	60	60	104	300	0
Peritr	2560	420	2433	660	3420	460	3160	2880	640	1160	1520	200	1240	280	540	1300	940	987	1480	1827	938	3033	2740
Prorod	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	59	0	0

	CT2-1	CT2-2	CT2-3	CT2-4	CT2-5	CT2-6	CT2-7	CT2-8	CT2-9	CT2-10	CT2-11	CT2-12	CT2-13	CT2-14	CT2-15	CT2-16	CT2-17	CT2-18	CT2-19	CT2-20	CT2-21	CT2-22	CT2-23
Pflag	82527	165000	5000	80000	175000	145000	455080	250000	75000	60000	85000	70000	140000	95000	60000	40000	0	45000	100000	360000	95000	155000	980000
Gflag	0	21	55	0	67	130	162	14	104	14	516	242	96	69	448	0	0	26	244	192	81	83	0
Atest	180	859	625	181	135	81	11	14	0	0	0	0	0	1803	10368	12314	9181	5499	8302	2413	3695	870	1018
Adesn	500	8837	1305	408	740	2596	8669	14221	2226	5601	1289	1940	2103	537	1494	43	14541	1269	38034	4470	3170	10145	67749
Ameb	680	9695	1929	590	875	2677	8679	14235	2226	5601	1289	1940	2103	2340	11862	12357	23722	6768	46336	6884	6865	11015	68767
Rotif	100	84	37	30	0	16	11	14	207	122	29	15	36	191	179	236	212	53	266	137	81	21	48
Nema	0	0	0	0	17	0	0	41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26	0	82	40	21	16
Gastr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	0	0	0	21	0
Aneli	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Metaz	100	84	37	30	17	16	11	55	207	122	29	15	36	191	239	236	212	79	266	219	121	62	65
Hetero	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hipotr	60	796	10639	11025	7922	5663	2940	602	259	1790	3381	2258	2892	555	627	0	769	7376	0	2441	2948	704	921
Esticotr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pleuro	80	3937	349	91	336	2044	454	9184	1941	976	3467	1697	2916	1057	1763	0	610	1005	4937	1728	2484	1470	4281
Filof	60	0	459	998	135	97	335	27	52	285	258	303	789	173	418	64	80	767	0	0			

	CXCD1	CXCD2	CXCD3	CXCD4	CXCD5	CXCD6	CXCD7	CXCD8	CXCD9	CXCD10	CXCD11	CXCD12	CXCD13	CXCD14	CXCD15	CXCD16	CXCD17	CXCD18	CXCD19	CXCD20	CXCD21	CXCD23
Begg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
T B63	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0
T041f	2	0	2	2	2	3	2,5	3	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
T701	0	0	0	1	2	2	2	1	0	3	3	0	0	0	0	3	1	3	2	2	3,5	4
T02N	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	2	2	0	0
T02N*	2	2	2	2	1	2,5	3	3	3,5	3,5	4	5	2	4	4	1	2,5	2,5	4,5	4,5	3	4
Mparv	4	5	5	5	3,5	3	4	4	5	5	5	5	5	4	2,5	0	0	0	0	0	0	3
T0581	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,5	3,5	3,5	3,5	2,5	3,5	5	4,5	4
GALO	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
T0803	2	2	0	2	2	2	2	3	1,5	2	3	2	4	4	2	3	2,5	2,5	2	2	3	2
T0041	1	1	1	1	1	1	0	0	2	2,5	3	3	2,5	3	3,5	3	3,5	2,5	3,5	3,5	3,5	3
T0092	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	2,5	3,5	4	4,5	5	4,5	4
NimIII	2	2	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3,5	3	2	1	0	0	0	1	2	1	1
NimI	0	0	0	2	2	3	3	4	4	3	3	3	2	1	1	2	0	0	3,5	0	0	0
Hhydr	2	0	2	2	2	3,5	2	4	3	3	2	4	3	3	4	4	3,5	4	5	4,5	5	4,5
CX2-03	2	2	1	2	2	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CX2-02	2	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trichoc	1	0	0	2	4	4	4	4	4	3	1	2	3	2	2	2	2	0	0	0	1	0
Aeurop	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2	1	1
Mbatav	2	2	3	2	3	3	1	1	5	0	3	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NimII-Chl	3	3	5	5	5	4	4	5	5	4	5	5	5	3	1	0	0	0	0	0	0	0
Tjapon	0	1	3	2	2	1	0	0	0	1	4	3	3	3	3	3	2	0	5	4	3	3
Isosph	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Teikelb	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tniv	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tfruct	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G23T	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1,5	0	1	1	0
T0803-cal	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	4	4
T0803-I	2	2	2	2	2	0	0	0	0	1	3	5	5	5	5	0	1	1	1	3	2	1
T0803-D	3	3	1	1	1	1	2	3	3	3	3	5	5	5	5	3	3	4	3	5	4	5
T0092-A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	1	2	4	4	5	4	0
T0092-B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	1	2	2	2	0
HHY	4	4	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5
MPA645	4	5	5	5	5	4	3	5	5	5	5	5	5	4	3	0	1	0	0	0	0	0
Mcalid	0	0	0	0	0	0	0	1	5	4	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
MPA1410	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	1	1	0	1	0	0	1	2
MPA60	0	0	0	0,5	0	0	3,5	2	5	5	5	5	5	3	3	0	0	0	0	0	0	2,5

	DN1	DN2	DN3	DN4	DN5	DN6	DN7	DN8	DN9	DN10	DN11	DN12	DN13	DN14	DN15	DN16	DN17	DN18	DN19	DN20	DN21	DN23
Begg	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0
T B63	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T701	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Thioth	2	3	2	2	2	2	2,5	2,5	2	2	2	1	2	0	0	0	0	2	0	2	2	2
T02N	0	0	1	0	0	1	0	0	2	3	0	2	0	2	2	1	0	0	0	1	0	0
T02N*	1	1	2	2	2	2	2	0	2	1	0	1	0	1	0	1	0	2	2	1	0	0
Mparv	2	3	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	3	3	3	3	4,5	5
GALO	1	0	1	2	2	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T0803	3	3	3	3,5	3,5	4	4	3,5	4	4	4	4,5	4	4	4,5	4	4	4	4,5	3	4	4
T0041	2	2	2	2	2	3,5	2	3	3,5	3	3	3	3,5	3	3	3	2,5	3,5	3	3	3	2,5
T0092	4	5	5	5	5	4	4	4	4,5	4,5	4,5	4	4,5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
NimIII	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	4	4	5	3	3	3	3	3	3,5
NimI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3,5	3,5	0	0	0	0
Hhydr	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	4	4,5	4	3,5	3,5
Trichoc	0	0	0	1	4	3	4	3	2	1	1	3	3	3	3	2	2	2	0	0	0	0
Aeurop	1	1	3	3	4	3	4	3	3	3	3	0	1	0	2	1	2	2	2	2	2	1
Mbatav	1	0	1	1	1	0	2	2	2	3	2	1	1	1	1	1	1	2	3	2	2	3
Tjapon	0	0	0	0	1	1	1	1	3	4	1	1	1	2	2	1	1	1	0	4	3	1
Isosph	3	3	3	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
Teikelb	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tniv	1	1,5	1,5	1,5	1	1	1	0	0	0	1,5	2	1	1	1	1	1	2	1,5	1,5	2	1
Tfruct	2	2	3	3,5	3	2,5	2	2	2	2	1,5	1	1	1,5	1	1	1	1	1,5	2	2	2
G23T	3	2	3	3	3	1,5	1	1	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	2,5	2	2	2
T0803-cal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
T0803-I	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
T0803-D	4	4	4	5	4	5	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
T0092-A	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
T0092-B	4	4	4	4	3	3	3	3	3	3	0	3	1	1	3	5	5	5	5	5	5	5
T0914-a	0	0	0	0	0	1	4	5	5	5	0	0	0	0	1	5	4	4	4	5	2	3
HHY	5	4	5	4	4	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	4	4	5	5	5	4

	CT1-1	CT1-2	CT1-3	CT1-4	CT1-5	CT1-6	CT1-7	CT1-8	CT1-9	CT1-10	CT1-11	CT1-12	CT1-13	CT1-14	CT1-15	CT1-16	CT1-17	CT1-18	CT1-19	CT1-20	CT1-21	CT1-22	CT1-23	
T#63	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T0411	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
T701	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2	2	1	0	0	0	0	0
Thioth	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
T02N	2	0	2	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0
T02N*	0	0	0	0	2	2	0	2	2,5	1	1	3	2	0	3	1	1	2	3	3,5	2,5	3	0	0
Mparv	2	2	2,5	3	3	3	3	3	3,5	4	3	3	3	3	4	0	0	3	3	3,5	3	2,5	5	5
GALO	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4,5	4,5	4	3	4	4	3	4	4	3	4	5	5	5
T0803	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4,5	4,5	4,5	4	4	4
T0041	2	2	2	2	2	3	2,5	2	2,5	2	2,5	2,5	2,5	2,5	2	2,5	3	3	3	4	3	2,5	2	2
T0092	3	3	3	3	4	4,5	3,5	3,5	3,5	3,5	4	3	4	4	5	4,5	5	5	5	5	5	3	4	4
NimIII	0	0	0	1	2	2	1	1	1	2	1	2	2	1	3	0	1	3	2	2	2	2	1	1
NimI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	3	2,5	4	2	4,5	5	5	4	4	3	4	4
Hhydr	0	0	2	2	3,5	0	3,5	0	2	0	3,5	2,5	3	4	4	4	4,5	4,5	5	4,5	4	4	3	3
T#51	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	4	3,5	3,5	3,5	3,5	4,5	5	4	4,5	5	4	5	4	4,5	4,5	5	4	4	4
Tniv	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tfruct	0	1	2	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0
G23T	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1
T0803-cal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
T0803-I	3	3	3	5	5	3	3	3	5	5	4	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
T0803-D	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	5	4	4	5	5	5	5
T0092-A	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
T0914-a	0	0	0	3	3	0	0	3	5	5	0	0	5	5	0	5	5	5	5	5	0	1	4	4
Gord	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4	4	3	4	4	3	4	5	5	5
HHY	5	4	5	5	4	5	4	5	4	5	5	4	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5

	CT2-1	CT2-2	CT2-3	CT2-4	CT2-5	CT2-6	CT2-7	CT2-8	CT2-9	CT2-10	CT2-11	CT2-12	CT2-13	CT2-14	CT2-15	CT2-16	CT2-17	CT2-18	CT2-19	CT2-20	CT2-21	CT2-22	CT2-23	
T#63	0	0	0	0	0	1	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T0411	0	0	0	0	0	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
T701	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2,5	2	0	0	0	0	0
Thioth	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1
T02N	2	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
T02N*	0	0	2	2	2	2	0	2	2	0	2,5	3	2	2	3	1	0	2	3,5	3	3,5	2,5	4	4
Mparv	2	2	2	3	2	2,5	2	3	4	4	3,5	4	4	3	3	0	0	0	0	1	2	15	3	3
GALO	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4,5	3	3	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5
T0803	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4,5	4,5	3,5	4	4	4
T0041	2	3	2	2	2	1	2	2	3	2	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2	2	2,5	3,5	3	3	2,5	3	3
T0092	3	3	4	4	4	4,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	4	4	4,5	4	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	2,5	3	2,5	2,5
NimIII	0	0	2	2	2	3	3	3	2	3	3	3	2	3	1	2	1	0	1	3	2	2	2	2
NimI	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	2	3	2,5	4	4	5	4,5	4	4	3	3	3
Hhydr	0	0	2	2	3	0	3,5	2	0	2	3,5	2,5	2	4	4	3	3,5	3,5	3,5	4	3	3	3	3
T#51	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	4	3,5	3,5	3,5	3,5	4,5	4,5	4	4,5	4	4	3	4	4	4	3	4	4	4
Tniv	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tfruct	1	2	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1
G23T	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	3	1	0	0
T0803-cal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
T0803-I	3	4	5	5	5	3	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
T0803-D	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	3	4	4	4	4	5	5	5	5
T0092-A	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4
T0914-a	0	1	0	3	3	0	0	3	4	4	0	0	5	5	5	0	4	4	4	4	4	0	5	1
Gord	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	4	4	4	4	5	5	5	5	4	5	5	5
HHY	5	4	5	4	3	5	4	4	4	4	5	4	5	4	5	5	5	5	5	5	5	0	5	5

Tabla 8.12. Valores de las variables ambientales en los muestreos de los biorreactores QB, CXAB, CXCD, DN, CT1 y CT2.

	QB1	QB2	QB3	QB4	QB5	QB6	QB7	QB8	QB9	QB10	QB11	QB12	QB13	QB14	QB15	QB16	QB17	QB18	QB19	QB20	QB21	QB22	QB23	QB24	QB25	
EF	8.2	7.7	5.7	7.9	5.2	5.7	7.3	7.8	6.5	7.6	5.4	29.0	119	119	13.0	8.2	10.0	9.5	11.7	23.1	17.8	11.4	8.3	13.2	15.9	
CM	0.2	0.26	0.25	0.2	0.24	0.24	0.37	0.32	0.34	0.8	0.47	0.16	0.14	0.5	0.08	0.22	0.12	0.15	0.16	0.8	0.14	0.12	0.11	0.14	0.5	
CMDDQOs	0.5	0.23	0.22	0.8	0.8	0.2	0.31	0.27	0.31	0.16	0.49	0.13	0.12	0.14	0.1	0.21	0.11	0.12	0.15	0.8	0.14	0.11	0.1	0.1	0.14	
TRHr	15.9	15.9	15.0	15.0	17.1	15.4	15.4	15.8	15.0	15.3	13.6	17.2	15.9	17.7	15.2	13.5	15.6	15.6	17.6	15.6	15.7	15.0	15.2	21.9	22.0	
TRHds	7.3	6.2	8.2	7.2	8.4	7.9	5.3	6.3	7.5	7.6	4.7	4.9	4.2	4.9	5.1	5.1	4.1	4.6	3.9	3.8	3.9	4.0	6.1	5.1	7.6	
T+r	18.0	18.0	17.3	17.0	18.1	18.8	20.0	20.7	19.9	20.5	21.5	22.7	24.5	25.8	27.2	28.5	26.7	24.5	26.0	22.4	23.0	20.7	14.4	18.4	18.0	
OB	81	86	0	4	4	14	33	13	34	38	92	24	83	33	35	50	28	28	28	28	28	34	34	37	27	
OM	19	14	67	96	95	86	67	52	66	63	8	76	14	66	65	50	72	72	72	72	72	66	66	63	73	
OA	0	0	33	0	1	0	0	35	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
pHLM	7.52	7.43	7.48	7.07	7.28	7.36	7.26	7.38	7.61	7.63	7.7	7.4	7.05	7.29	7.23	7.34	7.45	7.65	7.79	7.39	7.54	7.47	7.55	7.59	7.49	
CondLM	2440	2740	2480	2560	2450	2490	2420	2560	2650	2070	2300	172	1788	1820	1730	1760	1643	1590	1745	2020	1623	1510	1330	1511	2000	
SSLM	2410	2035	2485	2190	2005	1830	1805	2370	2560	2470	1790	2940	2870	3120	2390	2965	2240	2430	2400	2650	2450	2660	2430	2950	3058	
%SSVLM	82	83	81	78	79	80	81	79	82	82	87	83	77	80	80	77	75	78	80	78	74	77	68	77	82	
Rrec	18	2.1	2.0	2.2	2.0	2.1	2.0	1.7	1.6	1.6	1.4	1.3	1.4	1.2	1.3	1.3	1.5	1.7	1.3	1.5	1.7	1.1	1.4	1.0		
IVF30	124	118	129	110	120	142	133	127	141	162	156	150	167	141	59	81	98	99	100	75	114	94	103	122	116	
IVF5	249	226	258	228	249	262	244	245	281	324	302	286	307	256	100	182	152	156	183	143	245	165	206	217	235	
NtLM	92	98	107	99	108	88	85	81	85	85	82	67	61	54	52	74	63	46	56	42	50	48	63	41	49	
PTLM	29	24	32	34	33	31	24	32	25	27	19	25	22	24	37	33	36	34	24	30	40	30	35	30	24	
DQLM	144	144	163	149	152	15	15	153	138	149	142	125	142	131	135	143	134	128	134	149	143	133	145	139	126	
%DQOs	45	62	52	42	45	47	53	53	58	57	75	44	44	44	47	49	47	44	47	67	60	56	48	51	56	45
DQO/DBO	18	15	18	18	17	18	17	16	17	16	14	18	16	17	2.3	16	19	15	16	19	19	2.1	19	19	19	
CS	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.55	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	
CSO4	0.17	0.23	0.22	0.19	0.26	0.21	0.27	0.19	0.24	0.18	0.33	0.14	0.17	0.16	0.24	0.24	0.26	0.17	0.22	0.20	0.22	0.23	0.14	0.12	0.1	
CNT	46.6	69.7	56.3	66.7	63.8	69.9	91.8	60.6	68.4	47.1	102.0	33.1	37.5	34.2	33.8	41.1	38.0	31.0	36.2	43.2	32.3	28.8	29.9	33.4	29.6	
CN-NH4	30.8	49.7	78.1	63.0	65.9	59.2	98.9	91.7	43.2	88.5	100.3	47.0	61.7	51.6	80.7	89.4	89.1	36.1	14.4	43.9	48.0	43.9	36.3	50.0	69.9	
CNi	0.39	0.43	0.4	0.29	0.3	0.45	0	0.4	0.35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CZn	0.12	0.27	1.88	2.4	0.63	1.2	0.42	0.17	0.19	0.19	5.22	2.99	4.19	2.25	3.11	3.87	2.79	1.66	2.42	2.95	3.7	2.26	2.37	1.56	0.96	
CTA	0.87	3.9	0.96	4.93	3.08	3.52	4.28	6.14	5.94	3.99	10.2	13.1	19.8	18.2	12.5	3.24	4.11	1.58	1.55	3.37	3.39	2.3	1.2	1.22	1.71	
CPT	3.8	6.1	5.4	6.8	5.7	8.7	9.0	6.9	6.8	4.5	8.3	3.7	3.3	2.9	3.3	4.0	3.4	3.0	3.5	4.0	3.3	3.5	2.2	6.1	1.8	
CP-PO4	3.8	6.1	5.4	6.8	5.7	8.7	9.0	6.9	6.8	4.5	8.3	3.7	3.3	2.9	3.3	4.0	3.4	3.0	3.5	4.0	3.3	3.5	2.2	6.1	1.8	
CCarb	5.4	9.3	10.9	10.6	7.8	14.5	19.0	10.7	9.8	6.7	19.3	4.9	7.3	7.2	6.0	6.6	6.3	5.0	5.8	6.6	5.1	8.0	4.3	3.7	8.4	
CProte	25.2	79.9	52.4	68.7	67.3	68.2	140.5	81.9	77.0	63.9	137.2	42.6	72.0	43.8	29.9	56.0	42.2	38.7	39.6	49.7	40.1	36.3	39.6	46.1	60.0	
CAG	9.5	15.8	15.4	15.4	20.5	21.2	31.7	24.6	18.0	18.5	31.7	9.8	16.7	7.2	4.0	9.9	9.5	6.7	7.7	6.6	9.2	8.9	5.8	13.1	14.2	
CAGV	0.0	15.8	22.7	0.0	10.7	0.0	73.2	68.8	91.0	44.2	297.2	0.0	0.0	21.3	0.0	29.1	0.0	0.0	4.5	29.1	38.7	0.0	0.0	5.5	0.0	
DBO5/NT	3.2	4.7	4.6	3.6	4.4	4.0	5.5	5.7	5.8	5.0	7.9	4.4	4.4	4.9	2.7	4.8	3.1	5.2	5.3	3.9	4.4	3.7	3.9	4.4	3.0	
DBO5/PT	39.3	53.0	47.8	35.7	50.0	32.1	56.3	50.0	57.8	52.8	97.9	40.0	50.0	58.3	27.3	50.0	34.4	52.8	55.6	41.9	43.8	30.0	51.6	24.1	48.9	

	CXAB1	CXAB2	CXAB3	CXAB4	CXAB5	CXAB6	CXAB7	CXAB8	CXAB9	CXAB10	CXAB11	CXAB12	CXAB13	CXAB14	CXAB15	CXAB16	CXAB17	CXAB18	CXAB19	CXAB20	CXAB21	CXAB22	CXAB23	
EF	3.8	3.9	3.8	3.3	3.3	3.5	3.4	4.3	5.9	6	7.6	5.7	5.7	5.9	5.7	16	19.3	14	7.3	21.7	7.9	8		
CM	0.36	0.44	0.38	0.4	0.49	0.33	0.36	0.51	0.46	0.25	0.22	0.41	0.48	0.4	0.4	0.16	0.1	0.19	0.22	0.17	0.24	0.36		
CMDDQOs	0.21	0.16	0.22	0.14	0.19	0.15	0.2	0.17	0.21	0.17	0.18	0.22	0.26	0.29	0.25	0.12	0.08	0.12	0.12	0.16	0.12	0.12	0.12	
TRHr	6.1	6.6	6.3	6.9	6.9	6.9	6.9	5.1	5.8	6.9	6.5	6.7	5.6	6.6	6.3	6.1	6.1	6.5	6.5	6.3	6.4	6.5		
TRHds	8.8	9.6	9.0	9.9	9.9	9.9	9.9	7.3	8.4	9.9	9.3	9.6	8.0	9.5	9.1	8.8	8.8	9.4	9.3	9.0	9.2	9.4		
T+r	16.6	16.8	15.7	17.2	16.4	17.2	18	15	20	21.7	23.2	23.2	23.2	26.3	26.6	25	22	23.4	22	20.1	20.2	16.8		
OB	0	0	0	0	0	0	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
OM	1	2	0	0	9	0	35	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
OA	99	98	100	100	91	100	48	100	98	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
pHLM	7.73	7.55	7.22	7.33	7.65	7	7.1	7.34	7.32	7.32	7.56	7.56	7.88	7.5	7.55	7.33	7.31	7.34	7.32	7.6	7.5	7.48		
CondLM	1600	2040	1950	2050	1794	946	1261	1720	1506	1580	1760	1699	1314	1676	1348	102	1536	1477	1480	2540	1700			
SSLM	1735	2020	1930	2350	1890	1610	1580	1330	1100	1660	1560	1700	1550	1230	125	2590	2980	2320	1870	2860	2750	2065		
%SSVLM	85	87	89	88	81	86	80	83	82	85	85	85	84	77	82	78	70	77	91	84	86	85		
Rrec	13	14	10	13	0.9	17	16	14	14	19	18	12	17	2.3	14	12	19	15	14	11	11	10		
IVF30	92	109	145	136	74	99	101	120	200	118	141	153	103	89	124	85	74	86	107	112	109	92		
IVF5	161	218	415	272	119	174	177	218	364	312	256	300	181	154	231	224	128	147	182	182	211	165		
NtLM	112	132	101	109	128	140	105	98	98	96	96	72	74	85	87	85	80	80	84	87	80	92		
PTLM	22	25	24	27	32	39	32	29	23	23	19	24	24	23	20	28	25	22	20	20	19	20		
DQLM	144	142	144	154	148	149	133	145	142	133	123	121	132	148	136	139	146	133	125	136	13	133		
%DQOs	32	16	21	2	30	21	8	30	33	35	32	32	41	33	30	34	45	38	34	35	26	28		
DQO/DBO	2.7	3.5	2.2	2.7	2.3	2.5	2.6	1.9	1.8	1.8	2.7	2.1	1.6	2.3	2.0	2.0	1.7	1.9	1.9	2.5	2.0	1.9		
CS	0.00																							

	CT1-1	CT1-2	CT1-3	CT1-4	CT1-5	CT1-6	CT1-7	CT1-8	CT1-9	CT1-10	CT1-11	CT1-12	CT1-13	CT1-14	CT1-15	CT1-16	CT1-17	CT1-18	CT1-19	CT1-20	CT1-21	CT1-22	CT1-23
EF	5,3	7,3	5,6	8,3	7,2	9,0	4,8	4,1	7,4	4,8	4,3	2,7	5,5	3,1	8,4	6,6	6,4	6,8	7,3	5,6	3,9	5,1	5,3
CM	0,25	0,17	0,21	0,16	0,28	0,27	0,14	0,31	0,26	0,45	0,33	0,43	0,62	0,37	0,23	0,25	0,23	0,36	0,27	0,13	0,32	0,2	0,24
CMDQOs	0,34	0,18	0,25	0,2	0,29	0,27	0,16	0,51	0,27	0,44	0,28	0,38	0,35	0,26	0,22	0,33	0,12	0,38	0,24	0,13	0,27	0,18	0,14
TRHr	5,7	5,0	5,5	6,0	5,2	5,2	5,0	4,8	5,0	5,0	4,7	4,7	4,8	5,5	5,3	6,3	6,0	5,8	5,8	5,9	6,3	6,0	6,0
TRHds	5,3	4,8	4,9	5,2	4,7	4,7	4,5	4,3	4,5	4,5	4,3	4,2	4,2	5,1	4,9	5,5	5,3	5,4	5,4	5,3	5,6	5,3	5,3
T+r	17,0	17,0	17,0	18,0	19,0	19,0	19,0	20,0	23,0	24,0	25,0	26,0	26,0	28,0	29,0	27,0	24,0	26,0	24,0	23,0	23,0	16,0	19,0
OB	33	88	63	94	57	60	44	49	67	36	50	53	60	8	54	55	21	59	24	0	0	9	0
OM	54	83	52	79	49	65	14	36	75	42	51	40	43	10	65	50	26	27	27	17	0	4	1
OA	42	23	52	43	47	38	53	50	19	47	44	50	40	50	46	53	79	78	83	90	88	94	94
CO3	46,6	416	33,9	39,1	38,7	34,7	33,7	27,8	47,3	47,8	35,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
pHLM	7,02	7,01	7,15	7,23	7,48	7,1	6,87	7,07	7,24	7,51	7,07	6,65	7,4	7,02	7,33	7,15	7,3	7,17	7,26	7,27	7,27	6,95	7,39
CondLM	2940	4560	3400	2340	3200	3040	4470	2750	2690	2490	2620	2540	2390	2420	2240	1875	2490	3050	2940	2820	2600	4850	3560
SSLM	4070	6010	4410	4930	4360	6240	4350	3650	5980	3850	4890	3850	4980	3350	3870	3030	3500	3060	2890	2640	2850	3270	3240
%SSVLM	72	72	78	73	76	73	69	73	72	75	73	74	71	64	69	72	73	72	78	70	72	68	68
Rrec	14	12	0,9	1,7	1,3	0,7	1,3	1,5	1,8	1,1	1,4	1,7	0,8	1,6	1,2	1,8	1,8	1,7	1,3	1,1	1,9	2,0	1,1
IVF30	88	93	82	81	101	103	92	93	107	104	123	114	161	108	103	106	126	131	138	136	126	92	111
IVF5	157	160	145	146	183	179	166	170	187	177	221	197	273	179	186	185	217	235	263	242	239	177	198
NTLM	40	39	61	50	70	65	43	91	49	74	53	37	30	39	41	51	46	96	91	51	59	41	34
PTLM	59	47	53	55	57	62	69	71	67	60	54	59	57	75	65	72	52	48	42	63	90	73	66
DQLM	160	148	143	145	149	145	137	139	141	138	147	126	153	139	127	139	138	140	132	145	177	148	143
%DQOs	56	46	51	63	54	51	50	58	46	39	40	46	40	44	39	44	24	46	38	66	43	29	30
DQO/DBO	18	2,4	1,9	1,7	1,9	2,0	2,6	2,2	1,8	2,0	2,2	1,7	2,1	1,6	2,6	2,7	2,6	2,1	1,9	2,0	2,1	3,1	2,3
CNT	911	38,2	83,2	65,7	89,0	72,6	101,7	82,3	115,7	82,7	99,9	78,2	91,3	76,2	82,1	96,3	84,6	92,1	128,6	115,3	105,6	95,6	
CN-NH4	68,7	34,0	61,8	53,2	66,1	58,3	75,5	121,4	62,3	84,3	72,0	78,2	63,1	73,0	66,3	62,9	76,1	77,2	77,7	97,6	94,2	88,3	73,5
CPT	12,8	5,9	10,2	12,5	13,9	15,3	24,7	36,8	13,4	19,8	13,3	16,7	19,2	17,7	18,2	8,7	14,7	10,8	13,2	22,2	17,3	16,3	18,4
CP-PO4	9,9	4,2	9,9	9,9	15,0	12,7	18,6	30,1	11,3	15,1	9,2	10,9	10,3	14,6	9,2	6,9	10,0	9,0	9,8	13,8	14,5	12,6	11,4
CCarb	14,4	11,3	8,8	8,3	8,1	9,2	15,4	22,1	6,7	11,6	8,0	11,7	9,6	12,2	8,3	8,7	10,1	11,0	10,8	13,3	17,3	9,6	12,9
CProte	73,5	89,0	51,7	46,9	86,3	74,7	109,4	147,1	63,4	114,1	86,7	106,5	61,7	109,6	82,9	90,9	79,4	73,5	93,9	102,0	19,2	96,0	10,3
CAG	38,4	25,0	26,5	11,5	27,0	25,6	29,3	34,9	22,3	36,4	5,3	30,0	23,3	20,3	13,3	14,0	20,3	29,4	19,9	26,6	25,0	32,6	49,6
CAGV	0,0	0,0	18,4	45,9	97,1	0,0	97,2	0,0	88,6	46,3	0,0	0,0	0,0	4,9	37,0	70,6	29,1	85,1	92,8	0,0	127,2	18,8	35,3
DBO5/NT	4,04	3,06	3,48	3,33	3,64	3,52	2,12	2,63	3,11	3,86	3,23	4,17	2,98	4,67	2,28	2,34	2,28	3,7	3,33	164	2,83	2,18	2,31
DBO5/PT	8	5,6	8,1	12	14	15	16	20	12	12	10	10	14	8,7	11	5	8,7	5,9	7,3	10	9	8,5	10

	CT2-1	CT2-2	CT2-3	CT2-4	CT2-5	CT2-6	CT2-7	CT2-8	CT2-9	CT2-10	CT2-11	CT2-12	CT2-13	CT2-14	CT2-15	CT2-16	CT2-17	CT2-18	CT2-19	CT2-20	CT2-21	CT2-22	CT2-23
EF	9,0	12,0	6,0	12,0	6,0	10,0	5,0	7,0	8,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	6,0	310	17,0	10,0	110	5,0	9,0	6,0	6,0
CM	0,20	0,18	0,20	0,13	0,24	0,21	0,31	0,21	0,20	0,16	0,20	0,22	0,47	0,28	0,36	0,29	0,60	0,17	0,27	0,20	0,26	0,20	
CMDQOs	0,18	0,18	0,25	0,17	0,26	0,18	0,21	0,22	0,18	0,22	0,20	0,20	0,17	0,23	0,21	0,26	0,23	0,34	0,09	0,16	0,25	0,28	
TRHR	5,1	5,1	5,5	6,0	6,0	6,2	5,3	5,6	6,2	5,3	5,6	5,4	5,1	5,8	5,5	5,1	4,9	5,3	5,4	5,2	5,5	5,0	4,8
TRHds	6,0	5,1	5,4	6,0	5,7	6,3	5,1	5,4	5,9	5,1	5,3	5,0	5,1	5,4	5,3	5,0	4,7	5,1	5,1	4,8	5,3	4,7	4,7
T+r	18,0	17,0	17,0	18,0	19,0	19,0	19,0	20,0	23,0	23,0	25,0	25,0	27,0	29,0	29,0	27,0	24,0	26,0	24,0	23,0	23,0	15,0	18,0
OB	0	76	75	99	70	65	67	73	52	72	58	78	72	33	45	48	13	60	15	53	45	16	7
OM	29	40	55	79	47	55	44	50	55	59	54	58	52	55	32	44	19	31	20	20	50	19	13
OA	51	31	49	39	31	38	47	50	51	36	47	41	40	56	64	36	76	63	78	82	52	87	63
CO3	47,2	45,2	31,8	21,9	7,3	0,0	0,0	0,0	9,5	34,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
pHLM	7,05	7,13	6,97	7,21	7,6	7,1	6,85	6,94	7,2	7,38	7,55	6,9	7,2	7,43	7,18	7,3	7,3	7,28	7,18	7,12	7,26	6,91	7,5
CondLM	2940	4490	3340	3140	2930	3040	3100	2780	2700	2480	2450	2210	2340	2360	2290	1895	2550	3070	2960	2830	2430	4840	3680
SSLM	3675	3510	4000	4860	4370	4530	6800	5370	2840	5420	5100	4850	6150	4240	2460	3420	2770	2780	3320	2680	3640	3550	4550
%SSVLM	72	74	80	78	80	73	72	73	71	74	71	73	73	66	61	68	66	73	81	72	73	68	69
Rrec	17	2,0	0,9	1,8	1,6	1,6	1,2	1,5	1,5	1,1	1,3	1,4	1,3	1,6	1,7	1,5	1,7	1,8	1,0	1,0	1,3	1,7	1,0
IVF30	152	125	160	148	146	124	106	104	106	111	140	132	78	75	65	64	72	116	108	101	82	90	97
IVF5	283	239	300	280	275	221	200	186	197	192	234	239	143	123	114	117	116	209	193	187	148	169	167
NTLM	32	42	66	99	109	63	33	60	55	40	49	31	43	34	48	36	32	88	85	39	37	41	32
PTLM	57	61	27	44	50	63	65	74	65	59	52	57	55	74	76	63	57	38	31	49	62	68	62
DQLM	152	145	139	14	153	148	145	146	152	137	143	13	143	13	133	14	138	142	137	146	137	143	147
%DQOs	55	46	55	62	55	51	34	55	49	42	33	30	15	26	33	26	39	27	39	31	27	27	
DQO/DBO	18	2,9	1,9	1,9	2,1	1,6	2,1	1,7	2,2	2,5	1,8	1,8	2,0	3,1	1,2	1,2	3,1	2,3	1,3	1,7	2,3	3,3	2,7
CNT	120,1	62,6	84,7	61,3	78,5	107,8	59,2	95,9	156,2	70,1	70,3	47,6	88,5	93,2	156,2	82,5	145,3	54,0	82,7	163,4	97,9	113,2	84,0
CN-NH4	916	513	72,2	48,1	63,8	80,5	43,7	72,7	117,2	51,2	51,9	31,7	46,2	58,8	102,1	66,4	107,6	46,5	65,4	99,7	79,7	88,1	62,6
CPT	14,1	9,6	12,5	12,3	14,7	19,5	12,7	19,8	34,9	12,6	11,5	10,3	29,8	22,9	25,2	9,5	20,2	7,4	11,5	33,2	16,6	29,4	18,3
CP-PO4	8,8	6,3	12,3	10,5	14,0	15,7	10,7	18,7	19,5	9,2	6,4	4,9	8,8	11,2	15,7	6,6	15,0	5,8	8,8	14,5	13,6	17,1	12,0
CCarb	15,8	11,2	9,7	6,6	9,8	11,7	8,2	9,9	14,4	5,2	5,8	5,6	6,7	9,8	15,0	10,1	13,5	6,3	10,3	19,4	10,0	8,4	6,1
CProte	77,4	65,8	80,6	50,0	90,8	93,5	45,5	61,7															

Tabla 8.13. Valores de los componentes del nitrógeno en los muestreos de los biorreactores QB, CXAB, CXCD, DN, CT1 y CT2.

	QB1	QB2	QB3	QB4	QB5	QB6	QB7	QB8	QB9	QB10	QB11	QB12	QB13	QB14	QB15	QB16	QB17	QB18	QB19	QB20	QB21	QB22	QB23	QB24	QB25
Nt	36.5	46.5	41.0	32.5	24.5	29.0	26.0	48.0	46.0	5.0	28.5	6.0	6.5	8.5	13.5	16.0	12.2	10.0	12.0	28.6	6.5	7.2	10.2	24.2	13.4
rNt	47	38	43	53	63	54	64	35	45	73	51	60	82	80	60	57	66	73	68	38	79	78	75	55	83
Nts	29.5	33.0	29.0	17.0	20.5	27.0	23.0	42.5	45.0	14.0	25.5	8.0	6.2	5.6	12.5	9.8	118	9.7	13.2	26.2	6.5	6.6	9.6	23.1	13.0
rNts	50	48	54	70	63	50	60	35	38	73	48	75	79	83	50	67	59	68	61	28	73	74	77	55	81
N-NH4	12.9	19.7	16.0	18	7.3	14.1	14.1	32.6	32.6	2.9	13.3	0.3	2.4	12	4.1	4.1	0.9	2.3	10.6	13.6	0.1	0.1	0.6	116	15
rN-NH4	72	63	69	96	85	69	71	44	47	94	58	99	92	96	83	86	97	93	68	42	99	100	98	73	98
N-NO2	163	108	270	5.26	5.67	3.15	0.82	145	155	0.85	128	0.22	0.61	0.19	100	121	0.12	0.34	0.04	2.02	0.34	0.32	0.22	0.40	150
N-NO3	111	8.1	6.6	7.5	5.6	7.5	4.0	5.1	9.2	9.4	3.6	4.9	3.2	2.0	7.4	3.9	10.6	7.7	0.4	4.6	4.7	5.3	7.9	7.2	7.8
Nox	12.7	9.2	9.3	12.8	11.3	10.7	4.8	6.6	10.8	10.3	4.9	5.1	3.8	2.2	8.4	5.1	10.7	8.0	0.4	6.6	5.0	5.6	8.1	7.6	9.3
NKT	23.8	37.3	31.7	19.7	13.2	18.3	212	415	35.3	4.8	23.6	10.9	2.7	6.3	5.1	10.9	15	2.0	116	22.0	15	16	2.1	16.6	4.1
rNKT	65	50	56	71	80	71	71	44	58	92	59	73	93	85	85	71	96	95	69	52	95	95	95	69	95
NKts	16.8	23.8	19.7	4.2	9.2	16.3	18.2	36.0	34.3	3.8	20.6	2.9	2.4	3.4	4.1	4.7	11	17	12.8	19.6	15	10	15	15.5	3.7
rNKts	72	62	68	93	83	70	68	45	52	93	58	91	92	90	84	84	96	95	62	46	94	96	96	70	95
%N-NO2	12.8	118	29.0	41.2	50.3	29.6	17.0	22.1	14.4	8.3	26.2	4.3	16.0	8.6	119	23.7	11	4.2	10.0	30.5	6.7	5.7	2.7	5.3	16.1

	CXAB1	CXAB2	CXAB3	CXAB4	CXAB5	CXAB6	CXAB7	CXAB8	CXAB9	CXAB10	CXAB11	CXAB12	CXAB13	CXAB14	CXAB15	CXAB16	CXAB17	CXAB18	CXAB19	CXAB20	CXAB21	CXAB22	CXAB23
Nt	24.6	29.1	35.4	36.6	38.9	33.8	24.5	16.3	17.6	23.9	16.9	16.7	20.2	19.1	20.5	16.0	8.9	16.9	17.0	21.1	18.0	23.7	28.3
rNt	44	67	55	56	36	50	21	63	62	35	57	66	53	60	52	29	56	43	58	59	56	54	27
Nts	24.6	29.1	35.4	36.6	38.9	33.8	24.5	16.3	17.6	23.9	16.9	16.7	20.2	19.1	20.5	16.0	8.9	16.9	17.0	21.1	18.0	23.7	28.3
rNts	44	67	55	56	36	50	21	63	62	35	57	66	53	60	52	29	56	43	58	59	56	54	27
N-NH4	7.7	19.0	17.1	16.1	18.5	12.8	11.0	3.5	18	14	0.4	13	18	14	0.2	0.1	0.1	0.1	0.3	0.4	0.1	0.2	0.9
rN-NH4	72	40	45	52	55	65	19	85	93	93	98	94	94	94	99	99	99	100	99	99	100	99	97
N-NO2	0.99	1.21	0.98	1.04	0.80	1.83	103	0.94	101	0.41	0.51	0.34	0.71	0.55	0.35	0.14	0.04	0.07	0.02	0.13	0.33	0.39	168
N-NO3	8.6	9.3	7.4	6.5	8.2	16.4	7.9	115	12.3	15.8	12.1	12.1	13.5	12.3	7.5	9.4	7.4	13.1	14.9	12.9	12.5	18.5	17.1
Nox	9.6	10.5	8.4	7.6	9.0	18.2	8.9	12.4	13.3	16.2	12.6	12.4	14.2	12.9	7.9	9.6	7.4	13.2	14.9	13.0	12.8	18.9	18.7
NKT	15.0	18.6	27.0	29.0	29.9	15.6	15.6	3.9	4.3	7.7	4.3	4.2	5.9	6.2	12.6	6.4	14	3.7	2.1	8.1	5.1	4.8	9.6
rNKT	39	36	24	21	23	54	36	76	75	68	75	75	70	67	38	60	84	78	88	62	71	80	66
NKts	15.0	18.6	27.0	29.0	29.9	15.6	15.6	3.9	4.3	7.7	4.3	4.2	5.9	6.2	12.6	6.4	14	3.7	2.1	8.1	5.1	4.8	9.6
rNKts	39	36	24	21	23	54	36	76	75	68	75	75	70	67	38	60	84	78	88	62	71	80	66
%N-NO2	10.3	115	116	13.7	8.8	10.0	115	7.5	7.6	2.6	4.0	2.7	5.0	4.3	4.4	15	0.5	0.5	0.2	10	2.5	2.1	8.9

	CXCD1	CXCD2	CXCD3	CXCD4	CXCD5	CXCD6	CXCD7	CXCD8	CXCD9	CXCD10	CXCD11	CXCD12	CXCD13	CXCD14	CXCD15	CXCD16	CXCD17	CXCD18	CXCD19	CXCD20	CXCD21	CXCD22	CXCD23
Nt	24.6	29.1	35.4	36.6	38.9	33.8	24.5	16.3	17.6	23.9	16.9	16.7	20.2	19.1	20.5	16.0	8.9	16.9	17.0	21.1	18.0	23.7	28.3
rNt	44	67	55	56	36	50	21	63	62	35	57	66	53	60	52	29	56	43	58	59	56	54	27
Nts	24.6	29.1	35.4	36.6	38.9	33.8	24.5	16.3	17.6	23.9	16.9	16.7	20.2	19.1	20.5	16.0	8.9	16.9	17.0	21.1	18.0	23.7	28.3
rNts	44	67	55	56	36	50	21	63	62	35	57	66	53	60	52	29	56	43	58	59	56	54	27
N-NH4	7.7	19.0	17.1	16.1	18.5	12.8	11.0	3.5	18	14	0.4	13	18	14	0.2	0.1	0.1	0.1	0.3	0.4	0.1	0.2	0.9
rN-NH4	72	40	45	52	55	65	19	85	93	93	98	94	94	94	99	99	99	100	99	99	100	99	97
N-NO2	0.99	1.21	0.98	1.04	0.80	1.83	103	0.94	101	0.41	0.51	0.34	0.71	0.55	0.35	0.14	0.04	0.07	0.02	0.13	0.33	0.39	168
N-NO3	8.6	9.3	7.4	6.5	8.2	16.4	7.9	115	12.3	15.8	12.1	12.1	13.5	12.3	7.5	9.4	7.4	13.1	14.9	12.9	12.5	18.5	17.1
Nox	9.6	10.5	8.4	7.6	9.0	18.2	8.9	12.4	13.3	16.2	12.6	12.4	14.2	12.9	7.9	9.6	7.4	13.2	14.9	13.0	12.8	18.9	18.7
NKT	15.0	18.6	27.0	29.0	29.9	15.6	15.6	3.9	4.3	7.7	4.3	4.2	5.9	6.2	12.6	6.4	14	3.7	2.1	8.1	5.1	4.8	9.6
rNKT	39	36	24	21	23	54	36	76	75	68	75	75	70	67	38	60	84	78	88	62	71	80	66
NKts	15.0	18.6	27.0	29.0	29.9	15.6	15.6	3.9	4.3	7.7	4.3	4.2	5.9	6.2	12.6	6.4	14	3.7	2.1	8.1	5.1	4.8	9.6
rNKts	39	36	24	21	23	54	36	76	75	68	75	75	70	67	38	60	84	78	88	62	71	80	66
%N-NO2	10.3	115	116	13.7	8.8	10.0	115	7.5	7.6	2.6	4.0	2.7	5.0	4.3	4.4	15	0.5	0.5	0.2	10	2.5	2.1	8.9

	DN1	DN2	DN3	DN4	DN5	DN6	DN7	DN8	DN9	DN10	DN11	DN12	DN13	DN14	DN15	DN16	DN17	DN18	DN19	DN20	DN21	DN22	DN23
Nt	6.6	6.6	7.7	8.5	5.2	10.3	8.8	4.9	4.6	6.5	3.6	5.9	6.1	6.4	8.7	10.7	8.9	4.6	9.3	8.8	7.2	8.0	7.6
rNt	78	85	86	79	89	82	82	91	86	84	91	89	92	90	89	84	79	83	87	91	85	82	78
Nts	6.4	6.4	7.3	8.3	5.1	9.3	5.3	5.0	5.4	3.3	5.4	5.4	5.3	7.5	9.4	7.8	4.0	8.3	7.2	7.1	5.4	6.8	
rNts	78	85	86	78	89	84	73	86	81	85	89	81	91	90	81	81	69	78	83	88	83	85	80
N-NH4	0.3	0.2	0.1	0.0	0.1	0.1	12	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.1	0.4	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	11	0.5	
rN-NH4	99	99	100	100	100	100	89	100	100	100	100	100	100	99	100	98	100	99	100	100	100	91	97
N-NO2	0.08	0.01	0.04	0.03	0.04	0.05	0.03	0.05	0.02	0.02	0.03	0.01	0.02	0.11	0.01	0.32	0.05	0.01	0.01	0.00	0.04	0.04	0.06
N-NO3	4.6	4.3	6.8	6.1	2.8	4.5	19	2.8	2.7	17	17	2.4	3.1	2.0	3.3	5.7	6.6	2.2	7.2	4.2	4.3	4.1	5.2
Nox	4.7	4.3	6.8	6.1	2.8	4.5	2.0	2.9	2.7	17	17	2.4	3.1	2.1	3.3	6.0	6.6	2.2	7.2	4.2	4.3	4.1	5.2
NKT	19	2.3	0.9	2.4	2.3	5.8	6.8	2.0	19	4.8	18	3.4	3.0	4.3	5.4	4.7	2.3	2.4	2.1	4.6	2.9	3.8	2.4
rNKT	94	95	98	94	95	90	86	96	94	89	95	93	96	93	93	93	95	91	97	96	94	91	93
NKts	17	2.0	0.5	2.2	2.2	4.8	3.4	2.2	2.3	3.6	1.5	3.0	2.3	3.2	4.2	3.4	12	18	11	3.0	2.7	13	16
rNKts	94	95	99	94	95	92	83	94	92	90	95	89	96	94	89	93	95	90	98	95	93	96	95
%N-NO2	16	0.3	0.6	0.4	1.3	1.1	15	1.9	0.5	1.3	1.8	0.2	0.7	5.2	0.4	5.2	0.8	0.4	0.1	0.0	0.9	1.0	1.1

	CT1-1	CT1-2	CT1-3	CT1-4	CT1-5	CT1-6	CT1-7	CT1-8	CT1-9	CT1-10	CT1-11	CT1-12	CT1-13	CT1-14	CT1-15	CT1-16	CT1-17	CT1-18	CT1-19	CT1-20	CT1-21	CT1-22	CT1-23
Nt	310	260	450	530	490	480	540	520	360	390	410	310	270	240	250	200	320	220	270	290	370	370	300
rNt	46	28	32	16	26	32	18	35	51	44	34	48	53	47	46	57	44	52	47	50	38	33	42
Nts	300	250	450	530	480	460	480	510	350	380	400	300	250	230	190	260	170	210	280	360	260	290	
rNts	42	29	25	10	4	21	20	35	45	30	27	41	49	36	44	54	43	60	52	38	33	48	42
N-NH4	240	240	420	430	440	450	400	400	180	340	370	240	180	160	170	120	250	44	140	200	300	200	180
rN-NH4	44	25	14	16	10	21	18	39	68	33	31	49	61	56	58	67	44	90	67	55	39	57	55
N-NO2	180	0,49	0,41	0,14	0,13	0,24	120	2,00	150	2,40	130	4,00	5,20	4,90	5,10	4,80	0,00	2,20	1,10	2,90	180	160	140
N-NO3	12	0,5	0,5	0,6	0,5	0,5	0,6	0,5	0,5	0,9	0,8	10	18	16	0,5	2,1	0,5	2,5	15	4,7	2,7	4,0	3,5
Nox	3,0	10	0,9	0,7	0,6	0,7	18	2,5	2,0	3,3	2,1	5,0	7,0	6,5	5,6	6,9	0,5	4,7	2,6	7,6	4,5	5,6	4,9
NKT	280	250	44,1	52,3	48,4	47,3	52,2	49,5	34,0	35,7	38,9	26,0	20,0	17,5	19,4	13,1	31,5	17,3	24,4	21,4	32,5	31,4	25,1
rNKT	51	31	33	17	27	33	21	38	54	49	37	57	65	61	58	72	45	62	52	63	46	43	52
NKts	27,0	24,0	44,1	52,3	47,4	45,3	46,2	48,5	33,0	34,7	37,9	25,0	18,0	16,5	17,4	12,1	25,5	12,3	18,4	20,4	31,5	20,4	24,1
rNKts	48	31	27	11	5	22	23	38	48	36	31	51	63	54	58	70	45	71	58	55	42	59	52
%N-NO2	60,0	49,5	45,1	20,3	20,6	32,4	67,8	80,0	75,0	72,7	61,9	80,2	74,3	75,4	91,1	69,6	0,6	46,8	42,3	38,2	40,0	28,6	28,6

	CT2-1	CT2-2	CT2-3	CT2-4	CT2-5	CT2-6	CT2-7	CT2-8	CT2-9	CT2-10	CT2-11	CT2-12	CT2-13	CT2-14	CT2-15	CT2-16	CT2-17	CT2-18	CT2-19	CT2-20	CT2-21	CT2-22	CT2-23
Nt	320	270	400	390	460	440	520	490	350	370	410	280	320	250	230	250	350	220	280	290	350	310	290
rNt	58	31	34	40	28	47	20	44	54	45	33	53	65	56	56	39	35	49	42	51	41	43	47
Nts	300	250	360	360	450	440	440	480	340	360	320	260	310	240	220	240	320	200	260	280	340	300	280
rNts	57	31	39	40	22	45	20	45	52	28	35	41	47	35	37	31	22	47	33	22	33	32	45
N-NH4	230	200	300	330	360	420	410	390	210	340	280	230	290	210	160	190	310	160	230	210	290	260	170
rN-NH4	60	38	42	35	31	32	15	41	63	31	38	43	40	42	56	42	23	57	39	42	40	38	59
N-NO2	0,66	0,29	0,32	0,50	0,72	0,38	1,10	1,40	3,20	1,20	1,20	1,30	0,70	1,90	2,80	2,60	0,00	1,70	0,85	2,70	1,90	1,30	1,50
N-NO3	14	0,5	1,8	2,1	1,3	0,5	0,5	0,5	3,6	0,5	2,1	1,1	1,3	0,5	2,5	1,8	0,5	2,3	1,4	3,6	2,5	2,6	3,2
Nox	2,1	0,8	2,1	2,6	2,0	0,9	1,6	1,9	6,8	1,7	3,3	2,4	2,0	2,4	5,3	4,4	0,5	4,0	2,3	6,3	4,4	3,9	4,7
NKT	29,9	26,2	37,9	36,4	44,0	43,1	50,4	47,1	28,2	35,3	37,7	25,6	30,0	22,6	17,7	20,6	34,5	18,0	25,8	22,7	30,6	27,1	24,3
rNKT	57	27	36	39	24	46	8	46	60	29	23	42	48	39	49	41	16	53	34	37	40	38	52
NKts	27,9	24,2	33,9	33,4	43,0	43,1	42,4	46,1	27,2	34,3	28,7	23,6	29,0	21,6	16,7	19,6	31,5	16,0	23,8	21,7	29,6	26,1	23,3
rNKts	60	33	43	44	26	46	23	47	62	31	41	46	50	42	52	44	23	58	39	40	42	41	54
%N-NO2	2,1	0,8	2,1	2,6	2,0	0,9	1,6	1,9	6,8	1,7	3,3	2,4	2,0	2,4	5,3	4,4	0,5	4,0	2,3	6,3	4,4	3,9	4,7

