



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

---

Estudio de la dinámica poblacional y actividad de los  
organismos nitrificantes en sistemas de depuración de  
aguas residuales

---

TESIS DOCTORAL  
Doctorado en Ingeniería del Agua y Medioambiental

Memoria presentada por:  
**Paula Barbarroja Ortiz**

Dirigida por:  
José Luis Alonso Molina  
Daniel Aguado García  
Luis Borrás Falomir

Valencia, abril de 2019



## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias al apoyo de muchas personas, a todas ellas les estoy muy agradecida. Especialmente a mis directores de tesis, en primer lugar al Dr. José Luis Alonso, no solo por abrirme las puertas del fascinante mundo de la microbiología, sino por guiarme con paciencia durante todo el camino. Gracias a su saber hacer, su diligencia y ética en el trabajo he crecido tanto en el ámbito profesional como en el personal a lo largo de estos años. A los Dr. Luis Borrás y Daniel Aguado, por su inestimable ayuda y sus aportaciones, me siento muy afortunada de haber contado con ellos para este reto.

A la Entidad de Saneamiento y Depuración de la Región de Murcia (ESAMUR) por la financiación del proyecto “Influencia de las variables operacionales y fisicoquímicas en la dinámica y estructura de la población de bacterias nitrificantes”, al Grupo de Química y Microbiología del Agua del IIAMA.

A la empresa de explotación Depuración de Aguas del Mediterráneo (DAM), a Eduardo, Javier y Laura, con quienes verdaderamente ha sido un placer trabajar. A todos los técnicos de laboratorio y jefes de planta de la EDAR Molina del Segura por su dedicación y esfuerzo durante el proyecto.

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 del IIAMA.

Muy especialmente quería agradecer al Dr. Peter Tagney sus aportaciones en los artículos de esta tesis. Gracias por su disposición a ayudarme, por su amistad y su apoyo durante todo este tiempo.

A mis compañeros del Grupo de Química y Microbiología del Agua, a Andrés, por su colaboración, por confiar en mi y compartir conmigo su experiencia. A Inma y Yolanda,

por estar siempre disponibles para dudas y consejos, en lo personal y lo profesional, también por su ayuda con el ATP y la metagenómica.

A mis compañeras de laboratorio, ya que en buena compañía los días pasan más a gusto: Irene Hortelano, Irene Cañigral, Laura, Paula, Julián, Rut, Jorge y Fidson. También a todos los que ha dejado su granito de arena, de manera particular a Zee, Jeisson y Sara por su bonita energía. Especialmente a Laura, por las figuras y ayuda con la metagenómica. También quería agradecer de manera especial a Irene, Fidson y Rut por contar con su amistad, me siento realmente afortunada por las cosas que hemos tenido la oportunidad de compartir.

A Marta, Ester y Liss con quienes empecé esta aventura, por sus sonrisas y por seguir manteniendo esta bonita amistad.

A Txema, porque creíste tanto en mí que no me quedó más remedio que aprender a creer en mí misma, por tu gran nobleza y corazón, siempre están conmigo.

A mis compañeras de formación de Sadhana por abrazarme siempre.

A Javi Moya, por cuidarme tanto, por las risas y los buenos ratos.

A Jesús, gracias por estar para lo bueno y para lo malo, gracias a ti he aprendido casi tanto como en esta tesis.

A Raúl, gracias por tu cálido apoyo y atención, por todo lo compartido y aprendido juntos, pero sobre todo gracias por ser valiente para vivir fiel a ti mismo.

A María por su amistad incondicional, podría escribir un capítulo entero de cosas por las que le doy las gracias.

A Leo, por su energía, su sonrisa y por tener siempre las puertas abiertas.

María, María Andrés, Leo y Teresa porque son la familia que se elige, por su paciencia y apoyo durante este tiempo.

A Mari, Nuria, Javi, Alfredo y Eli, porque también les hubiera elegido, gracias por estar ahí para las cosas importantes.

A mi familia por cuidarme siempre, especialmente a mi tío Viriato por su gran corazón y su cariño.

A mi madre, María Jesús, profundamente gracias por tu paciencia y tu amor incondicional. Es gracias a ti que hoy puedo estar escribiendo estas líneas, gracias por la educación que me has ofrecido y todas las posibilidades que me has abierto, pero sobre todo gracias por enseñarme a ver cuáles son las cosas realmente importantes en la vida. Gracias por tu ejemplo en el trabajo desinteresado hacia los demás, por tu coherencia y tu por tu manera sencilla de vivir. Gracias por ser una luchadora. Tu ejemplo me ha ayudado a encontrar la voluntad en los momentos difíciles y me motiva cada día a intentar ser la mejor versión de mi misma.

Quería expresar mi agradecimiento a aquellas personas que dedican su tiempo a la investigación científica, en cualquiera de sus ramas. Gracias por su compromiso con la sociedad y con este planeta, tan necesarios en estos tiempos.

Estas última líneas las reservo para mi padre Juan, porque detrás de la distancia existe un profundo agradecimiento que no he sabido expresar con acierto hasta ahora, de corazón gracias.



# Resumen

---





## RESUMEN

El nitrógeno que contienen las aguas residuales es un compuesto potencialmente contaminante para los ecosistemas acuáticos. Una de las alteraciones más graves que puede causar en el medio es la eutrofización. La eutrofización se inicia con el crecimiento excesivo de los productores primarios del ecosistema y desencadena una serie de cambios que pueden producir el agotamiento del oxígeno en el medio, toxicidad en agua y la pérdida de la biodiversidad.

Las estaciones depuradoras de aguas tienen un papel fundamental en la protección del medio ambiente. Estas instalaciones evitan la llegada de nutrientes (nitrógeno y fósforo) y otras sustancias contaminantes a los ecosistemas acuáticos. El sistema más utilizado para la eliminación de nitrógeno en las estaciones depuradoras de aguas residuales es el proceso biológico de nitrificación aerobia junto con la desnitrificación heterótrofa en condiciones anóxicas.

El rendimiento de los sistemas biológicos está directamente relacionado con la estructura de la comunidad bacteriana y su metabolismo. Por ello, es importante determinar las relaciones entre la comunidad bacteriana y los rendimientos de las instalaciones a escala real. Las técnicas moleculares, desarrolladas en las últimas décadas han permitido desvelar la gran diversidad microbiana presente en los sistemas de depuración. De manera particular, las técnicas de secuenciación genómica han permitido obtener información taxonómica y funcional de las comunidades microbianas. Estos avances han permitido ampliar los conocimientos existentes sobre la versatilidad metabólica de las bacterias del ciclo del nitrógeno. No obstante, la comprensión de las relaciones entre la estructura microbiana, su actividad y las cambiantes condiciones ambientales y operacionales de las plantas de tratamiento a escala real, es necesaria para asegurar tanto la calidad del efluente final, como la operación eficiente de estos sistemas.

En este trabajo se monitorizaron las variaciones temporales de las características fisicoquímicas del afluente, los parámetros operacionales y los rendimientos de eliminación del amonio en 6 reactores biológicos con sistemas de fangos activos, durante periodos mínimos de 11 meses. Para caracterizar las comunidades microbianas involucradas en el proceso de nitrificación e identificar los organismos clave en el proceso, se han utilizado

diferentes técnicas de biología molecular: hibridación *in situ* con sondas marcadas con fluoróforos (FISH), la secuenciación de segunda generación Illumina y secuenciación de tercera generación SMRT de PacBio, la cual no había sido utilizada hasta la fecha para el análisis de la microbiota de sistemas convencionales de eliminación de nutrientes. Para valorar la actividad de la biomasa nitrificante y de la biomasa heterótrofa se utilizaron técnicas respirométricas y técnicas para la cuantificación del ATP de última generación. Finalmente, para analizar el gran volumen de datos generado tras la aplicación de las diferentes técnicas, se utilizaron técnicas estadísticas de análisis multivariante, como los modelos de regresión lineal multivariante basados en la distancia (DISTLM). Estas técnicas estadísticas permitieron valorar la contribución de las variables ambientales a la variabilidad observada en la estructura de las comunidades de bacterias nitrificantes, los rendimientos de eliminación del nitrógeno y su actividad.

La combinación de las técnicas moleculares empleadas permitió determinar que *Nitrosomonas oligotropha*, *Nitrospira* spp. y *Nitrotoga* sp. fueron las principales responsable de los procesos de oxidación del amonio y del nitrito, respectivamente, en las EDAR analizadas. Los resultados alcanzados con las técnicas FISH e Illumina sobre la estructura de la población de bacterias nitrificantes fueron similares, y permitieron detectar los sesgos de la secuenciación SMRT de PacBio. Los modelos de regresión permitieron valorar la contribución de las bacterias nitrificantes a la eliminación del amonio y cuáles fueron los factores que influían en su abundancia en cada una de las EDAR. La carga orgánica, la concentración de sólidos volátiles, la concentración de oxígeno y la temperatura fueron las variables de mayor influencia en la abundancia de estas especies. Mientras que la carga de fósforo influyó, además, significativamente en su actividad. Este estudio reveló que la aplicación de ozono disminuye significativamente a los rendimientos de eliminación del amonio. Los resultados obtenidos ayudaron a mejorar la comprensión sobre el proceso de nitrificación en cada una de las EDAR y manifiestan la importancia de la dinámica poblacional de las bacterias nitrificantes en los rendimientos de eliminación del amonio en las EDAR. Estos resultados establecen que las técnicas moleculares para la identificación y cuantificación de las poblaciones nitrificantes, combinadas con respirometría y los modelos de ordenación multivariante empleados en esta tesis, son una herramienta fiable para la

monitorización y el control del proceso de nitrificación en sistemas de eliminación biológica de nitrógeno.

Los resultados de esta tesis sugieren que la medida de los sólidos suspendidos volátiles activos mediante técnicas de determinación de ATP de segunda generación puede mejorar el cálculo de las variables de diseño y control más habituales de las EDAR.

## RESUM

El nitrogen que contenen les aigües residuals és un compost potencialment contaminant per als ecosistemes aquàtics. Una de les alteracions més greus que pot causar al medi és l'eutrofització. L'eutrofització s'inicia amb el creixement excessiu dels productors primaris de l'ecosistema i desencadena uns canvis que poden produir l'esgotament de l'oxigen del medi, toxicitat en l'aigua i la pèrdua de la biodiversitat.

Les estacions depuradores d'aigües tenen un paper fonamental en la protecció del medi ambient. Aquestes instal·lacions eviten l'arribada de nutrients (nitrogen i fòsfor) i altres substàncies contaminants als ecosistemes aquàtics. El sistema més utilitzat per a l'eliminació de nitrogen en les estacions depuradores d'aigües residuals és el procés biològic de nitrificació aeròbia juntament amb la desnitrificació heteròtrofa en condicions anòxiques.

El rendiment dels sistemes biològics està directament relacionat amb l'estructura de la comunitat bacteriana i el seu metabolisme. Per això, és important determinar les relacions entre la comunitat bacteriana i els rendiments de les instal·lacions a escala real. Les tècniques moleculars desenvolupades en les últimes dècades han permès revelar la gran diversitat microbiana present en els sistemes de depuració. De manera particular, les tècniques de seqüenciació genòmica han permès obtenir informació taxonòmica i funcional de les comunitats microbianes. Aquests avanços han permès ampliar els coneixements existents sobre la versatilitat metabòlica dels bacteris del cicle del nitrogen. No obstant això, la comprensió de les relacions entre l'estructura microbiana, la seua activitat i les canviants condicions ambientals i operacionals de les plantes de tractament a escala real, és necessària per a assegurar tant la qualitat de l'efluent final, com l'operació eficient d'aquests sistemes.

En aquest treball es van monitorar les variacions temporals de les característiques fisicoquímiques de l'afluent, els paràmetres operacionals i els rendiments d'eliminació de l'amoni en 6 reactors biològics amb sistemes de fangs actius, durant un període mínim de 11 mesos. Per a caracteritzar les comunitats microbianes involucrades en el procés de nitrificació i identificar els organismes clau en el procés, s'han utilitzat diferents tècniques de biologia molecular: hibridació in situ amb sondes marcades amb fluoròfors (FISH), la

seqüenciació de segona generació Illumina i seqüenciació de tercera generació SMRT de PacBio, la qual no havia estat utilitzada fins avui per a l'anàlisi de la microbiota dels sistemes convencionals d'eliminació de nutrients. Per a valorar l'activitat de la biomassa nitrificant i de la biomassa heteròtrofa es van utilitzar tècniques respiromètriques i tècniques per a la quantificació de l'ATP d'última generació. Finalment, per a analitzar el gran volum de dades generat després de l'aplicació de les diferents tècniques, es van utilitzar tècniques estadístiques d'anàlisi multivariant, com els models de regressió lineal multivariant basats en la distància (DISTLM). Aquestes tècniques estadístiques van permetre valorar la contribució de les variables ambientals a la variabilitat observada en l'estructura de les comunitats de bacteris nitrificants, els rendiments d'eliminació del nitrogen i la seua activitat.

La combinació de les tècniques moleculars emprades va permetre determinar que *Nitrosomonas oligotropha*, *Nitrospira* spp. i *Nitrotoga* sp resultaren les espècies nitrificants responsables del procés d'oxidació de l'amoni i del nitrit en cadascuna de les EDAR analitzades. Les tècniques FISH i Illumina van mostrar resultats molt similars sobre l'estructura de la població de bacteris nitrificants i van permetre detectar els biaixos de la seqüenciació SMRT de PacBio. Els models de regressió van permetre valorar la contribució dels bacteris nitrificants a l'eliminació de l'amoni i quins van ser els factors d'influència en la seua abundància en cadascuna de les EDAR. La concentració de matèria orgànica, sòlids volàtils en suspensió, la concentració d'oxigen i la temperatura foren les variables amb més influència en l'abundància d'aquestes espècies. Així mateix la càrrega de fòsfor va influir, a més a més en la seua activitat. Aquest estudi va determinar que l'aplicació ozó va causar una disminució significativa dels rendiments d'eliminació del amoni. Aquests models van ajudar a millorar la comprensió sobre el procés de nitrificació en cadascuna de les EDAR i resalten la importància de la dinàmica poblacional dels bacteris nitrificants en el rendiments de l'eliminació de l'amoni. Els resultats estableixen que les tècniques moleculars per a la identificació i quantificació de les poblacions nitrificants, combinades amb respirometria i els models d'ordenació multivariant emprats en aquesta tesi, són una eina fiable per al monitoratge i el control del procés de nitrificació en sistemes d'eliminació biològica de nitrogen.

Els resultats d'aquesta tesi suggereixen que la mesura dels sòlids suspesos volàtils actius mitjançant tècniques de determinació d'ATP de segona generació pot millorar el càlcul de les variables de disseny i control més habituals de les EDAR.

**ABSTRACT**

Ammonia from wastewater can be toxic in water environments to fish and other aquatic life. At sufficiently high levels, ammonia also contributes to eutrophication. Eutrophication begins with excessive growth of plants and algae, resulting in oxygen depletion of the water body, toxicity effects and decreased biodiversity.

Wastewater treatment plants play an important role in environmental protection. These facilities protect aquatic ecosystems from excessive inputs of nutrients (nitrogen and phosphorous) and other pollutants. The most widespread system of nitrogen removal in wastewater treatment plants is a conventional method involving a biological process that combines aerobic nitrification with heterotrophic denitrification in the absence of oxygen.

The efficiency of biological systems is directly related to bacterial community structure and its metabolism. For this reason, it is important to determine the relationships between the bacterial community and a full-scale wastewater treatment plant's performance. Molecular techniques have revealed the great microbial diversity present in activated sludge systems. In particular, genomic sequencing techniques have provided taxonomic and functional information from microbial communities. These advances have expanded existing knowledge about the metabolic versatility of nitrogen cycle bacteria. However, greater understanding of the relationships between microbial structure, metabolic activity and environmental and operational conditions is now necessary to ensure effluent quality and to minimise operational costs.

In this work, the temporal variations of influent characteristics, operational parameters and ammonium removal efficiency in 6 bioreactors with activated sludge systems were monitored for at least eleven months. To characterize the microbial communities involved in the nitrification process and to identify the key process organisms, different molecular biology techniques were used: fluorescence in situ hybridization (FISH); second generation sequencing (Illumina), and third generation sequencing (SMRT PacBio). To assess the activity of nitrifying and heterotrophic bacteria, respirometric tests and second-generation ATP determination techniques were used. Finally, to analyse the large volume of data generated, statistical multivariate analysis techniques were used, including distance-based multivariate linear regression models

(DISTLM). These statistical techniques allowed us to assess the contribution of environmental variables to the variability observed in the nitrifying community structure, in nitrogen removal performance and nitrifying activity.

The combined molecular techniques employed determined that *Nitrosomonas oligotropha*, *Nitrospira* spp. and *Nitrotoga* sp. were the dominant nitrifying bacteria in the monitored WWTP. FISH and Illumina technique showed very similar results and allowed for the detection of biases in PacBio SMRT sequencing. The regression models determined the contribution of nitrifying bacteria to ammonium oxidation and the factors influencing their abundance and activity. The main factors influencing the nitrifying bacteria abundance were organic load, volatile suspended solids concentration, dissolved oxygen and temperature. The activity of nitrifying bacteria also was influenced by phosphorous loading rate. This study revealed that ozone concentration was the main factor determining the low ammonium removal performance. These models helped to improve our understanding of the nitrification process in each WWTP and highlight the importance of nitrifying bacterial community structure in nitrogen removal performance. The results establish that the molecular techniques for the identification and quantification of the nitrifying populations, combined with respirometry and the multivariate ordering models used in this thesis, are a reliable tool for the monitoring and control of the nitrification process. The results of this thesis suggest that the measurement of active volatile suspended solids by means of second-generation ATP determination techniques can improve calculation of the most common design and control parameters of WWTPs.



# INDICE

---



## ÍNDICE

1. Introducción .....	1
1.1 Antecedentes .....	3
1.2 Tratamientos convencionales para la depuración de aguas residuales .....	5
1.3 Definición de los principales parámetros operacionales de diseño en EDAR.....	6
1.4 El ciclo del nitrógeno.....	8
1.4.1 Alteraciones en el ciclo del nitrógeno .....	10
1.4.2 El nitrógeno en las aguas residuales urbanas .....	11
1.5 Sistemas para la eliminación de nitrógeno en las aguas residuales. ....	12
1.6 Bioquímica del proceso de nitrificación .....	19
1.7 Bacterias del proceso de nitrificación.....	21
1.7.1 Las bacterias oxidantes de amonio .....	23
1.7.2 Las bacterias oxidantes del nitrito .....	26
1.7.3 Principales factores que afectan a la actividad y la abundancia de las bacterias nitrificantes en las EDAR.....	29
1.8 Aplicación de ozono para el tratamiento de aguas residuales .....	34
1.9 Métodos moleculares para la identificación y cuantificación de poblaciones microbianas .....	37
1.9.1 Técnica molecular de hibridación in situ con sondas marcadas con fluoróforos (FISH).....	38
1.9.2 Metagenómica de secuenciación dirigida .....	40
1.10 Técnicas respirométricas para la medida de la actividad .....	52
1.11 Técnicas de cuantificación del ATP.....	54
1.12 Principales técnicas de ordenación multivariante empleadas en estudios de ecología.. .....	56

1.12.1 Exploración de datos.....	57
1.12.2 Pretratamiento de datos. ....	57
1.12.3 Análisis exploratorio multivariante.....	58
1.12.4 Interpretación ambiental.....	63
2. Objetivos .....	67
3. Materiales y métodos.....	71
3.1 Origen de las muestras de fango activo.. ....	73
3.2 Toma de muestras.....	76
3.3 Determinación de las variables fisicoquímicas .....	77
3.4 Determinación de variables operacionales .....	79
3.5 Identificación y cuantificación de poblaciones de bacterias nitrificantes mediante la técnica molecular FISH.....	80
3.5.1 Procesado de las muestras de fango activo para el análisis FISH .....	80
3.5.2 Fijación de las muestras .....	80
3.5.3 Hibridación de las muestras .....	81
3.5.4 Visualización de muestras y cuantificación con microcopía de epifluorescencia .....	84
3.6 Identificación y cuantificación de poblaciones nitrificantes mediante técnicas metagenómicas.....	86
3.6.1 Extracción y cuantificación del DNA.....	86
3.6.2 Amplificación y secuenciación masiva de genes ribosomales .....	86
3.7 Valoración de la actividad nitrificante mediante respirometría. ....	89
3.7.1 Equipo de respirometría.....	90
3.7.2 Análisis respirométricos. ....	92
3.8 Detección de la biomasa activa mediante técnicas de cuantificación del ATP .....	95

---

3.9	Análisis estadístico de datos .....	96
3.9.1	Análisis descriptivo y tratamiento preliminar de los datos .....	97
3.9.2	Análisis exploratorio .....	98
3.9.3	Análisis de interpretación ambiental.....	98
4.	Resultados.....	101
4.1	Estudio de la dinámica de las poblaciones de bacterias nitrificantes en las EDAR CT, CX, DN y QB .....	103
4.1.1	Resultados de la aplicación de la técnica FISH para la identificación y cuantificación de bacterias nitrificantes en las EDAR CT, CX, DN y QB. ....	103
4.1.2	Análisis de los rendimientos de eliminación de las fracciones del nitrógeno en las EDAR CT, CX, DN y QB.....	122
4.2	Estudio de la dinámica poblacional de las bacterias nitrificantes en la EDAR ML.....	143
4.2.1	Resultados de la aplicación de la técnica FISH para la identificación y cuantificación de bacterias nitrificantes en la EDAR ML.. ....	143
4.2.2	Análisis de los rendimientos de eliminación de nitrógeno en la EDAR ML. ....	152
4.3	Análisis de la actividad de las bacterias nitrificantes mediante respirometría .....	159
4.3.1	Evolución temporal de la actividad nitrificante en el EDAR ML .....	159
4.3.2	Interpretación ambiental de la actividad nitrificante .....	163
4.4	Aplicación de técnicas metagenómicas para la identificación y cuantificación de comunidades bacterianas en sistemas de fangos activos. ....	167
4.4.1	Resultados de la secuenciación dirigida del gen 16S rRNA de segunda generación haciendo uso de la plataforma Illumina.....	168
4.4.2	Resultados de la secuenciación dirigida del gen 16S rRNA de tercera generación haciendo uso de la plataforma PacBio.....	173
4.4.3	Modelos de interpretación ambiental.....	181
4.5	Valoración del índice de estrés y la carga másica calculada en función del ATP .....	187

5. Discusión.....	195
5.1 Análisis de la dinámica poblacional de las bacterias nitrificantes .....	197
5.1.1 Dinámica poblacional de las bacterias oxidantes del amonio.....	200
5.1.2 Dinámica poblacional de las bacterias oxidantes del nitrito .....	203
5.1.3 Variables ambientales y operacionales relacionadas con la dinámica poblacional de las bacterias nitrificantes .....	205
5.2 Análisis de la actividad de las bacterias nitrificantes determinada mediante respirometría.	213
5.2.1 Relación de las variables respirométricas con las variables ambientales.....	214
5.2.2 Relación de las bacterias nitrificantes con las variables respirométricas.....	215
5.3 Análisis de la biomasa activa mediante técnicas de medición de ATP de segunda generación.....	216
5.4 Rendimientos de eliminación del nitrógeno y su relación con la dinámica poblacional de las bacterias nitrificantes .....	219
5.4.1 Contribución de las poblaciones nitrificantes a la eliminación del amonio .....	219
5.4.2 Análisis de los rendimientos respecto a las variables ambientales y biológicas .....	220
5.5 Influencia del ozono en los sistemas biológicos de eliminación de nitrógeno .....	223
5.6 Composición de la comunidad de bacterias nitrificantes según metagenómica.....	226
5.6.1 Secuenciación mediante la plataforma Illumina . .....	226
5.6.2 Secuenciación mediante la plataforma PacBio y comparativa de las técnicas moleculares para la identificación y cuantificación de poblaciones microbianas .....	228
6. Conclusiones .....	233
7. Difusión de resultados.....	239

---

Referencias.....	243
Anexos.....	265
Anexo 1. Esquema de las EDAR analizadas en este estudio .....	267
Anexo 2. Preparación de reactivos y soluciones. Técnica FISH.....	270
Anexo 3. Abundancia relativa de las bacterias nitrificantes .....	276
Anexo 4. Tasas de respiración de las bacterias nitrificantes determinadas mediante respirometría .....	285
Anexo 5. Resumen estadístico. Variables fisicoquímicas y parámetros operacionales.....	287
Anexo 6. Resumen estadístico. Calidad del efluente y rendimientos de eliminación.....	290
Anexo 7. Calidad del efluente, rendimientos de eliminación, variables fisicoquímicas y parámetros operacionales medidos en la EDAR ML.....	291
Anexo 8. Calidad del efluente, rendimientos de eliminación, variables fisicoquímicas y parámetros operacionales medidos en la EDAR CT, CX, DN y QB.....	296
Anexo 9. Datos de ATP, SSVATP y CMATP .....	300

*INDICE DE TABLAS*

Tabla 1. Fraccionamiento del nitrógeno en las aguas residuales. ....	12
Tabla 2. Variables fisicoquímicas medidas en el licor mezcla. ....	77
Tabla 3. Variables fisicoquímicas medidas en el afluente al reactor y el efluente del decantador secundario. ....	78
Tabla 4. Variables operacionales registradas. ....	79
Tabla 5. Sondas utilizadas para la identificación de bacterias nitrificantes. ....	83
Tabla 6. Secuencias de los iniciadores 27F y BS-R407.....	88
Tabla 7. Media (M), desviación estándar (DE), valor máximo (Mx) y valor mínimo (Mn) de la abundancia relativa (%) de bacterias nitrificantes. ....	108
Tabla 8. ANOSIM a partir de las abundancias relativas de las variables biológicas según el factor reactor en las EDAR CT, CX, DN y QB. ....	116
Tabla 9. Resultados del test secuencial para el análisis DISTLM realizado entre las variables ambientales y bacterias nitrificantes en las EDAR CT, CX, DN y QB. ....	118
Tabla 10. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables ambientales y correlaciones de las variables biológicas con los ejes del dbrDA en la EDAR DN.....	119
Tabla 11. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables ambientales y correlaciones de las variables biológicas con los ejes del dbrDA en la EDAR QB. ....	121
Tabla 12. Rango, media y desviación estándar de las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus respectivos rendimientos de eliminación. ....	123
Tabla 13. ANOSIM a partir de las abundancias relativas de las variables biológicas según el factor reactor. ....	127
Tabla 14. Resultados del test secuencial para el análisis DISTLM realizado entre la concentración en el efluente del decantador secundario de las diferentes fracciones del nitrógeno y sus rendimientos de eliminación y las bacterias nitrificantes en las EDAR CT, CX, DN y QB. ....	128



Tabla 15. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación y correlaciones de las variables biológicas con los ejes del dbRDA en la EDAR CT .....	129
Tabla 16. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación y correlaciones de las variables biológicas con los ejes del dbRDA en la EDAR DN.....	131
Tabla 17. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación y correlaciones de las variables biológicas con los ejes del dbRDA en la EDAR QB .....	132
Tabla 18. Resultados del test secuencial para el análisis DISTLM realizado entre las variables ambientales y las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación en las EDAR CT, DN,QB y CX. ....	134
Tabla 19. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables ambientales y correlaciones de las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación con los ejes del dbRDA en la EDAR CT.....	135
Tabla 20. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables ambientales y correlaciones de las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación con los ejes del dbRDA en la EDAR CT.....	137
Tabla 21. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables ambientales y correlaciones de las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación con los ejes del dbRDA en la EDAR QB.....	139
Tabla 22. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables ambientales y correlaciones de las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación con los ejes del dbRDA en la EDAR CX .....	142
Tabla 23. Media (M), desviación estándar (DE), valor máximo (Mx) y valor mínimo (Mn) de la abundancia relativa (%) de bacterias nitrificantes en la EDAR ML .....	144
Tabla 24. Resultados del test secuencial para el análisis DISTLM realizado entre las variables ambientales y bacterias nitrificantes en la EDAR ML. ....	150
Tabla 25. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables ambientales y correlaciones de las variables biológicas con los ejes del dbRDA en la EDAR ML .....	150

Tabla 26. Resultados del test secuencial para el análisis DISTLM realizado entre las variables ambientales y las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación en la EDAR ML.....	155
Tabla 27. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables ambientales y correlaciones de las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación con los ejes del dbrDA en la EDAR ML.....	156
Tabla 28. Resultados del test secuencial para el análisis DISTLM realizado entre las bacterias nitrificantes y las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación en la EDAR ML.....	158
Tabla 29. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación y correlaciones de las variables biológicas con los ejes del dbrDA en la EDAR CT.....	158
Tabla 30. Media (M), desviación estándar (DE), valor máximo (Mx) y valor mínimo (Mn) de las tasas de respiración medidas en la EDAR ML.....	160
Tabla 31. Resultados del test secuencial para el análisis DISTLM realizado entre las variables ambientales y las variables respirométricas en la EDAR ML.....	164
Tabla 32. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables ambientales y correlaciones de las variables respirométricas con los ejes del dbrDA en la EDAR ML.....	164
Tabla 33. Resultados del test secuencial para el análisis DISTLM realizado entre las variables respirométricas y bacterias nitrificantes en la EDAR ML.....	166
Tabla 34. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables respirométricas y correlaciones de las variables biológicas con los ejes del dbrDA en la EDAR ML.....	166
Tabla 35. Media (M), desviación estándar (DE), valor máximo (Mx) y valor mínimo (Mn) de la abundancia relativa (%) de bacterias nitrificantes en la EDAR ML determinada con Illumina.....	173
Tabla 36. Media (M), desviación estándar (DE), valor máximo (Mx) y valor mínimo (Mn) de la abundancia relativa (%) de bacterias nitrificantes a nivel de género en la EDAR ML determinada con Pacbio.....	177

---

Tabla 37. Media (M), desviación estándar (DE), valor máximo (Mx) y valor mínimo (Mn) de la abundancia relativa (%) de bacterias nitrificantes a nivel de especie en la EDAR ML determinada con Illumina.....	180
Tabla 38. Resultados del test secuencial para el análisis DISTLM realizado entre las variables ambientales y bacterias nitrificantes en la EDAR ML.....	182
Tabla 39. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables ambientales y correlaciones de las variables biológicas con los ejes del dbrDA en la EDAR ML.....	183
Tabla 40. Resultados del test secuencial para el análisis DISTLM realizado entre las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación y bacterias nitrificantes en la EDAR ML.....	184
Tabla 41. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación y correlaciones de las variables biológicas con los ejes del dbrDA en la EDAR ML.....	185
Tabla 42. Rango y valores promedio de la carga másica y los sólidos activos calculados en función del ATP.....	187
Tabla 43. Rango y valores promedio de la carga másica y los sólidos activos calculados en función del ATP .....	188
Tabla 44. Resultados del test secuencial para el análisis DISTLM realizado entre la matriz ampliada de variables ambientales y las variables respirométricas de la biomasa autótrofa en la EDAR ML.....	192
Tabla 45. Coeficientes de correlación múltiple parcial de la matriz ampliada de variables ambientales y correlaciones de las variables respirométricas de la biomasa autótrofa con los ejes del dbrDA en la EDAR ML.....	192

*INDICE DE FIGURAS*

Figura 1. Esquema básico del proceso de fangos activos.....6

Figura 2. Ciclo del nitrógeno .....10

Figura 3. Transformaciones del nitrógeno en el proceso de nitrificación-desnitrificación vía nitrato.....14

Figura 4. Esquema Ludzack-Ettinger .....15

Figura 5. Esquema Ludzack-Ettinger modificado.....15

Figura 6. Esquema Wuhrman .....16

Figura 7. Representación esquemática de las capas estructurales de los gránulos aerobios. .... 17

Figura 8. Principales bacterias oxidantes del amonio..... 25

Figura 9. Principales bacterias nitrito oxidantes. .... 27

Figura 10. Protocolo FISH ..... 40

Figura 11. Diferentes aproximaciones metagenómicas.. .... 42

Figura 12. Representación gráfica del gen 16S rRNA. .... 43

Figura 13. Esquema de las tecnologías de secuenciación de segunda generación..... 44

Figura 14. Amplificación puente del DNA molde inmovilizado en plataforma Illumina.. ..... 45

Figura 15. Método de secuenciación mediante nucleótidos terminadores reversibles de Illumina. . 46

Figura 16. Esquema de trabajo en QIIME.....47

Figura 17. Célula SMRT conteniendo 150000 ZMW (zero-mode waveguide).....50

Figura 18. Difusión de la polimerasa en el ZMW. ....50

Figura 19. Proceso de secuenciación SMRT. ....51

Figura 20. Horquilla de secuenciación (SMRTbell).....52

Figura 21. Medida de las fracción de sólidos activos mediante ATP .....55

---

Figura 22. Vista aérea de la EDAR Quart-Benàger.....	73
Figura 23. Vista aérea de la EDAR Castellón .....	74
Figura 24. Vista aérea de la EDAR Carraixet.....	75
Figura 25. Vista aérea de la EDAR Denia-Ondara-Pedreguer.....	75
Figura 26. Vistas aérea de la EDAR Molina del Segura.. .....	76
Figura 27. Sondas utilizadas para la identificación de BOA. ....	82
Figura 28. Sondas utilizadas para la identificación de BON.....	82
Figura 29. Flujo de procesos para la cuantificación de bacterias nitrificantes .....	85
Figura 30. Secuencia de trabajo en el tratamiento bioinformático.....	89
Figura 31. Representación esquemática del respirómetro BM-Advance Pro.....	91
Figura 32. Representación gráfica del cálculo de la tasa de respiración endógena por respirometría.....	92
Figura 33. Medida de la tasa de respiración endógena autótrofa y heterótrofa.....	94
Figura 34. Diagrama del promedio de la abundancia relativa de las bacterias oxidantes del amonio y nitrito en las EDAR CT, CX, DN y QB.....	104
Figura 35. Bacterias oxidantes del amonio más frecuentes en las EDAR CT, CX, DN y QB.....	105
Figura 36. Bacterias oxidantes del nitrito más frecuentes en las EDAR CT, CX, DN y QB.....	106
Figura 37. Abundancia relativa de las bacterias nitrificantes en el reactor CT1.....	109
Figura 38. Abundancia relativa de las bacterias nitrificantes en el reactor CT2.....	109
Figura 39. Abundancia relativa de las bacterias nitrificantes en el reactor CX.....	110
Figura 40. Abundancia relativa de las bacterias nitrificantes en el reactor DN.....	111
Figura 41. Abundancia de las bacterias nitrificantes en el reactor QB. ....	112

Figura 42. Promedio de la abundancia relativa de las poblaciones nitrificantes detectadas por FISH en los reactores CT1, CT2, DN, QB y CX. ....	113
Figura 43. Raíz cuadrada de la abundancia relativa de las poblaciones nitrificantes detectadas por FISH en las EDAR DN, CT, QB y CX, representada a través del gráfico de trazado sombreado.....	114
Figura 44. Análisis clúster sobre los resultados del nMDS aplicado a la abundancia relativa de bacterias nitrificantes según el factor espacial.....	115
Figura 45. Análisis nMDS sobre los datos la abundancia relativa de bacterias nitrificantes según el factor estacional. ....	116
Figura 46. Gráfico de burbujas del porcentaje de tiempo en que el oxígeno se mantuvo en concentraciones entre 0,8 y 2mg/L (ODm) en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las variables ambientales y biológicas en la EDAR DN.. ....	120
Figura 47. Gráfico de burbujas de la carga másica en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las variables ambientales y biológicas en la EDAR DN.....	120
Figura 48. Gráfico de burbujas del %DQOs en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las variables ambientales y biológicas en la EDAR QB.....	122
Figura 49. Valores promedio y desviación estándar de las fracciones del nitrógeno del efluente en los reactores QB, CX, DN, CT1y CT2.....	124
Figura 50. Diagrama de cajas y bigotes del rendimiento de eliminación del NKT soluble (sNKTre) expresado en porcentaje, en los reactores CT1, CT2, CX, DN y QB.....	125
Figura 51. Diagrama de cajas y bigotes del nitrógeno amoniacal del efluente en mg/L (N-NH <sub>4</sub> ) en los reactores QB, CX, DN, CT1 y CT2.....	125
Figura 52. nMDS a partir de los componentes del nitrógeno del efluente según el factor espacial. ....	126
Figura 53. Gráfico de burbujas del rendimiento de eliminación del nitrógeno total soluble (rNTs) en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las fracciones del nitrógeno en el efluente, sus rendimientos de eliminación y variables biológicas en la EDAR CT.....	130

Figura 54. Gráfico de burbujas de la concentración de nitrato en el efluente en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación variables biológicas en la EDAR DN. ....	131
Figura 55. Gráfico de burbujas del rendimiento de eliminación del NKT soluble en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación y variables biológicas en la EDAR QB.....	133
Figura 56. Gráfico de burbujas de la concentración de ozono en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las variables ambientales y las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación en la EDAR CT.....	136
Figura 57. Gráfico de burbujas del porcentaje de tiempo que el oxígeno se mantuvo entre 0,8 y 2 mg/L en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las variables ambientales y las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación en la EDAR DN....	138
Figura 58. Gráfico de burbujas de la carga másica (CM) en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las variables ambientales y las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación en la EDAR QB ...	140
Figura 59. Gráfico de burbujas del tiempo de retención hidráulico en el decantador secundario (TRHds) y el porcentaje de DQO soluble afluente al proceso (%DQOs) en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las variables ambientales y las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación en la EDAR QB.....	141
Figura 60. Gráfico de burbujas de la carga de fósforo total (CPT) en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las variables ambientales y las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación en la EDAR CX.....	143
Figura 61. Diagrama del promedio de aparición de las diferentes especies de bacterias oxidantes del amonio y nitrito en la EDAR ML.....	145
Figura 62. Bacterias oxidantes del amonio y nitrito más frecuentes en la EDAR ML.....	146
Figura 63. Evolución temporal de la abundancia de bacterias nitrificantes en la EDAR ML determinada por FISH. ....	147
Figura 64. Raíz cuadrada de la abundancia relativa de las poblaciones nitrificantes detectadas por FISH en la EDAR ML representada a través del gráfico de trazado sombreado... ..	148

Figura 65. Análisis nMDS a partir de la abundancia relativa de bacterias nitrificantes según el factor estacional en la EDAR ML.....	149
Figura 66. Gráfico de burbujas del porcentaje de sólidos suspendidos volátiles del licor mezcla (%SSVLM) en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las variables ambientales y biológicas determinadas por FISH en la EDAR ML. ....	151
Figura 67. Gráfico de burbujas del porcentaje de la temperatura en el reactor biológico (Tra) en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las variables ambientales y biológicas determinadas por FISH en la EDAR ML.....	151
Figura 68. Evolución de la concentración de los componentes inorgánicos del nitrógeno en el efluente de la EDAR ML. N-NH <sub>4</sub> , concentración de amonio; N-NO <sub>2</sub> , concentración de nitrito; N-NO <sub>3</sub> , concentración de nitrato.....	152
Figura 69. Valores promedio y desviación estándar de las fracciones del nitrógeno del efluente en la EDAR ML. NTs, nitrógeno total soluble; N-NH <sub>4</sub> , concentración de amonio; N-NO <sub>2</sub> , concentración de nitrito; N-NO <sub>3</sub> , concentración de nitrato; NKT, nitrógeno Kjeldahl; NKTs, nitrógeno Kjeldahl soluble.....	153
Figura 70. Evolución temporal de los rendimientos del nitrógeno en la EDAR ML.....	154
Figura 71. Gráfico de burbujas del %SSVLM y Tar en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las variables ambientales en la EDAR ML. ....	157
Figura 72. Gráfico de burbujas del N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> y el rendimiento del NTs en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación y las variables biológicas determinadas por FISH en la EDAR ML.....	159
Figura 73. Evolución temporal de las tasas de respiración endógena en el fango activo de la EDAR ML.....	161
Figura 74. Evolución temporal de la tasa de respiración endógena de las bacterias autotrofas (OUR <sub>end.A</sub> ) y la tasa de respiración máxima por nitrificación (R <sub>s</sub> ) en el fango activo de la EDAR ML. ....	162
Figura 75. Evolución temporal de la tasa específica de respiración endógena de las bacterias autotrofas (SOUR <sub>end.A</sub> ) y la tasa específica de respiración máxima por nitrificación (R <sub>ps</sub> ) en el fango activo de la EDAR ML.....	163



---

Figura 76. Gráfico de burbujas de la temperatura en el reactor (Tar) y el porcentaje de sólidos suspendidos volátiles (%SSVLM) en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las variables ambientales y respirométricas en la EDAR ML. ....	165
Figura 77. Gráfico de burbujas de la OUR <sub>end.H</sub> y la R <sub>smax</sub> en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las variables respirométricas y biológicas en la EDAR ML.....	167
Figura 78. Valor promedio de la distribución por filo en las muestras de fango activo de la EDAR ML según Illumina.....	168
Figura 79. Distribución por filo de las bacterias presentes en cada una de las muestras de fango de la EDAR ML según Illumina.....	169
Figura 80. Valor promedio de la distribución por clase en las muestras de fango de la EDAR ML según Illumina.....	170
Figura 81. Distribución de las abundancias relativas a nivel de clase en cada una de las muestras de fango de la EDAR ML a partir de los resultados obtenidos con Illumina.....	171
Figura 82. Valor promedio de la distribución por género en las muestras de fango de la EDAR ML a partir de los datos obtenidos con Illumina.....	172
Figura 83. Distribución por género de las bacterias nitrificantes presentes cada una de las muestras de fango de la EDAR ML a partir de los resultados obtenidos con Illumina.....	173
Figura 84. Valor promedio de la distribución por género en las muestras de fango de la EDAR ML a partir de los resultados obtenidos con PacBio.....	174
Figura 85. Distribución por filo de las bacterias presentes cada una de las muestras de fango de la EDAR ML a partir de los resultados obtenidos con PacBio.....	175
Figura 86. Valor promedio de la distribución por género en las muestras de fango de la EDAR ML a partir de los resultados obtenidos con PacBio.....	176
Figura 87. Distribución por género de las bacterias presentes cada una de las muestras de fango de la EDAR ML a partir de los resultados obtenidos con PacBio.....	177
Figura 88. Distribución por género de las bacterias nitrificantes presentes cada una de las muestras de fango de la EDAR ML a partir de los resultados obtenidos con PacBio.....	178

Figura 89. Valor promedio de la distribución por género en las muestras de fango de la EDAR ML a partir de los resultados obtenidos con PacBio.....179

Figura 90. Distribución por clase de las bacterias presentes cada una de las muestras de fango de la EDAR ML a partir de los resultados obtenidos con PacBio.....179

Figura 91. Distribución por especie de las bacterias nitrificantes presentes cada una de las muestras de fango de la EDAR ML a partir de los resultados obtenidos con PacBio.....181

Figura 92. Gráfico de burbujas de la carga de nitrógeno amoniacal y la Tar en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables ambientales y la abundancia relativa de bacterias nitrificantes en la determinada por FISH y Illumina en la EDAR ML.....183

Figura 93. Gráfico de burbujas del nitrato (N-NO<sub>3</sub>) y el nitrógeno Kjeldhal soluble (NKTs) en el efluente y en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación y la abundancia relativa de bacterias nitrificantes en la determinada por FISH y Illumina en la EDAR ML.....186

Figura 94. Gráfico de burbujas del rendimiento de eliminación del nitrógeno total soluble (rNTs) en el dbrDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación y la abundancia relativa de bacterias nitrificantes en la determinada por FISH y Illumina en la EDAR ML.....186

Figura 95. Evolución del ATP disuelto, ATP celular y del Índice de estrés del sistema (BSI).....187

Figura 96. Valores de sólidos suspendidos volátiles del licor mezcla (SSVLM), los sólidos suspendidos volátiles activos del licor mezcla (SSVALM) y el índice de estrés del sistema (BSI)...188

Figura 97. Valores de la carga másica calculados en función de los sólidos suspendidos volátiles del licor mezcla (CM) y la carga másica calculada a partir de los sólidos suspendidos volátiles activos del licor mezcla (CMATP).....189

Figura 98. Correlación entre los sólidos suspendidos volátiles del licor mezcla (SSVLM) y los sólidos suspendidos volátiles activos del licor mezcla (SSVALM).....190

Figura 99. Correlación entre la carga másica calcula a partir de los sólidos suspendidos volátiles del licor mezcla (CM) y la carga másica calculada a partir de los sólidos suspendidos volátiles activos del licor mezcla (CMATP).....190

---

Figura 100. Comparativa de los valores determinados para el ATP celular (cATP) y la tasa de respiración endógena total (OUR <sub>end</sub> ).....	191
Figura 101. Gráfico de burbujas del rendimiento de eliminación del nitrógeno total soluble (rNTs) en el dBRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación y la abundancia relativa de bacterias nitrificantes en la determinada por FISH y Illumina en la EDAR ML.....	193

## ABREVIATURAS

AICC	Akaike Information Criterion corrected
AMO	Amonio monooxigenasa
Anammox	Eliminación anaerobia del amonio
ANOSIM	Analysis of similarity
ATP	Adenosin trifosfato
ARI	Aguas residuales industriales
ARU	Aguas residuales urbanas
AOA	Archaea oxidantes de amonio
AUR	Ammonium uptake rate
BIC	Bayesian Information Criterion
BOA	Bacterias oxidantes del amonio
BON	Bacterias oxidantes del nitrito
BN	Bacterias nitrificantes
CA	Correspondence analysis
CANON	Completely Autotrophic Nitrogen Removal over Nitrite
CAP	Canonical analysis of principal coordinates
CCA	Canonical correspondence analysis
CM	Carga másica, calculada a partir de la DBO5
CM (DQOs)	Carga másica, calculada a partir de la DQO soluble
Commamox	Oxidación completa del amonio
CondLM	Conductividad del licor mezcla
CT	Castellón (EDAR)
CX	Carraixet (EDAR)
DBO <sub>5</sub>	Demanda biológica de oxígeno a los 5 días
db-RDA	Distance-based redundancy analysis
DEAMOX	Denitrifying Ammonium Oxidation
DISTLM	Distance-based linear models
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DN	Denia-Ondara-Pedreguer (EDAR)
DQO	Demanda química de oxígeno
%DQOs	Porcentaje de la DQO soluble
EPS	Extracellular polymeric substances
EDAR	Estación depuradoras de aguas residuales
FISH	Fluorescence in situ hybridization
GAOs	Glycogen accumulating organisms
HAO	Oxidoreductasa hidroxilamina
HTS	High Throughput Sequencing
IFAS	Integrated fixed-film activated sludge
IVF	Índice volumétrico del fango a los 30 minutos
MBR	Bioreactores de membrana
NGS	Next Generation Sequencing
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Nitrógeno amoniacal
N-NO <sub>2</sub> -	Nitrógeno nitroso
N-NO <sub>3</sub> -	Nitrógeno nítrico
%N-NO <sub>2</sub> -	Porcentaje del nitrógeno nitroso respecto al total de nitrógeno
NT	Nitrógeno total
NKT	Nitrógeno kjeldhal total

nMDS	Non-metric multidimensional scaling
NXR	Nitrito oxidoreductasa
O <sub>3</sub>	Concentracion de 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
OLAND	Oxygen-Limited Autotrophic nitrification-denitrification
OUR <sub>end</sub>	Oxygen uptake rate
OUR <sub>end.A</sub>	Velocidad de consumo de oxígeno endógeno de biomasa autótrofa
OUR <sub>end.H</sub>	Velocidad de consumo de oxígeno endógeno de biomasa heterótrofa
PAOs	Polyphosphate accumulating organisms
PB	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCA	Principal component analysis
PCoA	Principal coordinate analysis
PCR	Polymerase chain reaction
PERMANOVA	Permutational multivariate analysis of variance
PFA	Paraformaldehido
P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Fósforo del ortofosfato
PT	Fósforo total
QB	Quart Benàger
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
rDNA	DNA ribosómico
RDA	Redundancy analysis
RNA	Ácido ribonucleico
Rs	Velocidad de consumo de oxígeno endógeno de biomasa nitrificante
R <sub>sp</sub>	Velocidad de consumo específica de oxígeno endógeno de biomasa nitrificante
SBR	Sequencing batch reactor
SMRT	Sole molecule-real time
SOUR <sub>end</sub>	Velocidad de consumo de oxígeno específica
SOUR <sub>end.H</sub>	Velocidad de consumo de oxígeno endógeno de biomasa heterótrofa específica
SOUR <sub>end.A</sub>	Velocidad de consumo de oxígeno endógeno de biomasa autótrofa específica
SSG	Secuenciación de segunda generación
SSLM	Sólidos suspendidos del licor mezcla
SST	Sólidos en suspensión totales
SSVLM	Sólidos suspendidos volátiles del licor mezcla
SSVALM	Sólidos suspendidos volátiles activos del licor mezcla
STG	Secuenciación de tercera generación
T <sup>a</sup> <sub>r</sub>	Temperatura del reactor biológico
TRC	Tiempo retención celular
TRH	Tiempo de retención hidráulico en el reactor biológico
TRHds	Tiempo de retención hidráulico en el decantador secundario
WGS	Whole Genome Sequencing



# 1. Introducción

---





## 1.1 ANTECEDENTES

Uno de los grandes retos de nuestro tiempo consiste en asegurar la conservación y la regeneración de los recursos naturales. El agua es un factor determinante para el desarrollo de la vida, además cumple importantes funciones económicas, sociales y ambientales. Aunque no es un recurso escaso, está distribuido de manera poco homogénea y solo una pequeña proporción se encuentra disponible para su uso. La demanda global de agua ha aumentado proporcionalmente con el crecimiento de la población, el aumento del desarrollo económico y los patrones de consumo. Así mismo, se ha producido un incremento en la cantidad y la carga contaminante de los vertidos generados. La conjunción de estos factores ha causado alteraciones en la dinámica de los ecosistemas, ya que afectan tanto a su capacidad de autodepuración, como a la renovación y redistribución del agua dentro del ciclo hidrológico. Esta situación provoca que preservar la calidad y cantidad de agua, necesaria para satisfacer la demanda actual y futura, requiera cada vez de ingeniería más compleja y tratamientos más eficientes, que aporten soluciones económicamente viables.

En las últimas décadas, el creciente interés por la protección de este vulnerable recurso ha motivado el desarrollo de políticas basadas en la eficiencia, reutilización y reciclado del agua. Estas se han traducido principalmente en la aplicación de herramientas legislativas para el control de vertidos, encaminadas a la reducción de la carga contaminante de los mismos. En el año 2000 la Unión Europea estableció un marco comunitario para la protección y gestión del agua (Directiva Marco 2000/60/CE), cuyo objetivo es proteger el estado ecológico de las masas de agua continentales, aguas de transición, aguas costeras y aguas subterráneas.

Desde hace más de cien años las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) tiene un papel fundamental en este desempeño, ya que son las encargadas de minimizar el impacto de los vertidos en el medio receptor. En estas instalaciones se han buscado nuevas configuraciones y tecnologías para hacer frente a los estándares de vertido reglamentarios, por lo que se han convertido en un instrumento esencial para la protección del medio ambiente. La mayor parte de las EDAR emplean procesos biológicos para la degradación de la materia orgánica, eliminación de nutrientes, sólidos en suspensión y

microorganismos patógenos, que son los principales compuestos contaminantes de las aguas residuales urbanas (ARU). Los sistemas biológicos de tratamiento de aguas residuales están basados en la explotación de la actividad concreta de determinados grupos de microorganismos. El conocimiento sobre la estructura de la comunidad microbiana y su relación con las condiciones ambientales y de proceso, son esenciales para el desarrollo y la optimización de los sistemas biológicos.

La eliminación de nutrientes suscita un especial interés entre los diferentes tipos de tratamientos que se incluyen o se han de incorporar a las EDAR, debido a los problemas de toxicidad y eutrofización que su vertido causa en ríos, lagos y costas. El incremento de la concentración de nitrógeno en las corrientes de agua, debido al aporte derivado de la actividad antropogénica, es una de las principales causas de esta problemática en la actualidad. Han sido varias las iniciativas legislativas comunitarias relacionadas con la protección de los ecosistemas acuáticos frente a la problemática de la eutrofización y la gestión más eficiente del agua.

- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo (Directiva Marco 2000/60/CE), 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 del Consejo, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas; modificada por la Directiva 98/15/CE de la Comisión de 27 de febrero de 1998 en la que se establece la obligación de disponer de sistemas colectores y tratar las ARU y aguas residuales industriales (ARI), así como los límites de vertido de los contaminantes procedentes de EDAR. La Directiva 91/271/CEE fue transpuesta al ordenamiento español a través del Real Decreto Ley 11/1995 de 20 de Diciembre, en el que se define 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.
- Real Decreto 1620/2007 de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. Este Real

Decreto tiene como objetivo aumentar la disponibilidad de los recursos hídricos, permitiendo disponer del agua residual depurada como recurso alternativo en determinados sectores.

Debido a la importancia que ha adquirido la eliminación de nitrógeno en las corrientes de agua residual, la nitrificación en las EDAR se ha convertido en uno de los procesos clave de la depuración.

## 1.2 TRATAMIENTOS CONVENCIONALES PARA LA DEPURACIÓN DE AGUAS RESIDUALES

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).

Cuando hablamos de procesos de tratamiento de cultivo en suspensión nos referimos principalmente a los sistemas de fangos activos. Este sistema es el tratamiento biológico más habitual en la depuración de las ARU y ARI asimilables a urbanas, y fue desarrollado en Inglaterra en 1914 por Arden y Lockett. Este proceso se basa en mantener un cultivo biológico en suspensión en un reactor aireado. La suspensión formada es denominada fango activo y es la responsable del proceso de depuración. La configuración básica del proceso de fangos activos consta de un reactor donde se mantiene un cultivo microbiano en suspensión capaz de asimilar la materia orgánica y otros contaminantes presentes en el agua residual. Para ello 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. 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). 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.

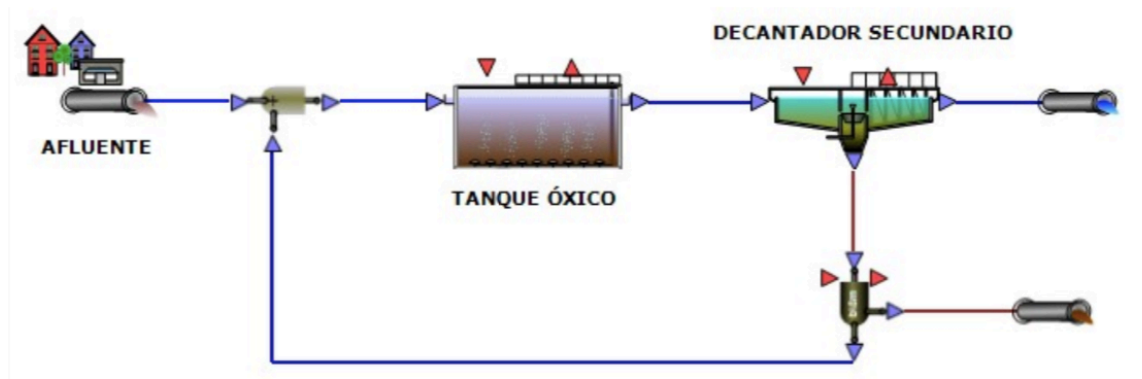


Figura 1. Esquema básico del proceso de fangos activos.

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 y en nueva biomasa.

La principal característica de los procesos de tratamiento de cultivo fijo o soporte sólido es que utilizan un material inerte que actúa como soporte, sobre el cual 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 afluyente. Esto da lugar a los dos tipos fundamentales de tratamientos mediante cultivo fijo: filtros percoladores y contactores biológicos rotatorios.

### 1.3 DEFINICIÓN DE LOS PRINCIPALES PARÁMETROS OPERACIONALES DE DISEÑO EN EDAR

La concentración de sólidos suspendidos en el licor mezcla (SSVLM) y el tiempo de retención celular (TRC) son los parámetros básicos de diseño en EDAR. Además de estos el tiempo de retención hidráulico (TRH), la carga másica y la concentración de oxígeno disuelto (OD) se utilizan habitualmente para el control de proceso en la explotación diaria de las instalaciones.

La carga másica (CM) representa la materia orgánica biodegradable ( $DBO_5$ ) que llega diariamente al tratamiento biológico en relación con la masa de fangos en el reactor, expresada en forma de SSVLM. En este caso la CM representa una aproximación de la relación entre el sustrato disponible y los 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, por ser un parámetro de determinación más rápida.

El TRC 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 medio de permanencia de los microorganismos en la EDAR, ya que estos permanecen en la EDAR al ser decantados y recirculados al reactor, hasta que salen por la corriente de purga de fangos en exceso.

El TRH se define como el tiempo que permanece un volumen del afluente en cualquier operación física unitaria o proceso biológico y varía en función del caudal de entrada. Se trata de un parámetro de control operacional muy utilizado en decantación primaria y secundaria. En el proceso biológico su cálculo es útil para estimar los tiempos disponibles para la eliminación de la fracción soluble de la materia orgánica. Conceptualmente dicha variable influye de forma directa en la CM, ya que condiciona el tiempo de contacto del sustrato con el aceptor de electrones.

El OD en el reactor es un parámetro fundamental para la operación del proceso de depuración. Valores elevados de OD causan un gasto energético innecesario, mientras que valores bajos pueden originar una depuración insuficiente. Por ello, la monitorización del OD es primordial para una explotación sostenible y el ajuste de los niveles necesarios para el cumplimiento de los objetivos en la depuración.

La temperatura viene impuesta principalmente por la estacionalidad y depende del tamaño del reactor, del sistema de aireación y la situación geográfica. La monitorización de este parámetro es clave para la regulación del resto de parámetros operacionales del

sistema, como la CM o el TRC, ya que la actividad de los microorganismos está condicionada por la temperatura.

## 1.4 EL CICLO DEL NITRÓGENO

El nitrógeno es un elemento esencial para los organismos vivos y el principal nutriente limitante de la vida en nuestro planeta. Es por ello que el ciclo biogeoquímico del nitrógeno es uno de los ciclos de nutrientes más importantes en los ecosistemas. La química del nitrógeno es compleja debido a los numerosos estados de oxidación en los que se puede presentar. Además, hay que tener en cuenta que el cambio de su estado de oxidación también puede ser llevado a cabo por organismos vivos. Principalmente son bacterias las que mantienen este ciclo al metabolizar compuestos de nitrógeno orgánicos e inorgánicos. Estos microorganismos crean complejas redes metabólicas que regulan la disponibilidad del nitrógeno en sus diferentes formas. Las investigaciones más recientes apuntan a que los microorganismos transformadores de nitrógeno son metabólicamente versátiles, por lo que su clasificación como meros nitrificadores, desnitrificadores y clases similares está siendo cuestionada (Kuypers *et al.*, 2018).

Aunque la mayoría de los organismos dependen de formas de nitrógeno más biodisponibles, como el amonio y el nitrato para su crecimiento, la mayor parte del nitrógeno se encuentra en la atmósfera. En la atmósfera este elemento se presenta en forma diatómica y estado gaseoso a temperatura y presión ordinaria; en su forma elemental es relativamente inerte. El nitrógeno atmosférico es fijado a través de procesos biológicos, aunque en ocasiones también es transformado como resultado de procesos químicos espontáneos. Los organismos responsables de esta fijación son bacterias simbióticas como *Rhizobium*, las Cianobacterias, bacterias de vida libre como *Azobacter* y algas, que transforman este nitrógeno en nitrógeno inorgánico asimilable por otros seres vivos ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$ ).

En el suelo el nitrógeno se encuentra principalmente en forma orgánica debido a la descomposición y a los procesos metabólicos de plantas y animales. El nitrógeno orgánico pasará a nitrógeno amoniacal tras la mineralización. La materia proteica no asimilable es convertida en gran medida a amonio por la acción de las bacterias saprófitas, bajo

condiciones aerobias o anaerobias. El amonio liberado puede ser usado por las plantas para producir proteínas y el sobrante tras esta asimilación puede ser oxidado por las bacterias nitrificantes. En el suelo, los nitratos producidos durante el proceso de nitrificación, pueden servir como fertilizantes para las plantas y, los que se producen en exceso, pueden acabar en el agua principalmente a través de la percolación y la escorrentía.

En el medio acuático el nitrógeno se encuentra mayoritariamente en forma de nitrógeno amoniacal o nitrógeno nítrico, aunque también puede estar presente como óxido nitroso y nitrógeno orgánico incorporado a sustancias orgánicas. La cantidad de nitrógeno en las masas de agua ha aumentado debido al uso de fertilizantes nitrogenados empleados en la agricultura, llegando a causar la contaminación de los recursos superficiales y subterráneos. En estos casos el nitrato es la forma predominante por tratarse del compuesto más estable.

Tanto en el suelo como en el agua, la proporción entre las formas del nitrógeno en sus diferentes estados de oxidación depende, en gran medida, de los procesos de nitrificación y desnitrificación.

Bajo condiciones anóxicas los nitritos y nitratos son reducidos a través del proceso de desnitrificación a nitrógeno gas, que regresará a la atmósfera. En la actualidad existen otros focos de emisión de compuestos nitrogenados originados por actividades antropogénicas como la quema de combustibles fósiles y los procesos industriales como la fabricación de abonos y amoniaco.

Las redes de transformación de nitrógeno microbiano (Figura 2) atenúan y exacerban el cambio global inducido por el hombre. Producen y consumen el óxido nitroso de los gases de efecto invernadero, conducen a la eutrofización de los sistemas acuáticos y, al mismo tiempo, eliminan el nitrógeno de las aguas residuales. Además de estas existen, todavía por descubrir, numerosas reacciones de transformación del nitrógeno termodinámicamente factibles, así como los microorganismos que las catalizan y las vías bioquímicas involucradas (Kuypers *et al.*, 2018).

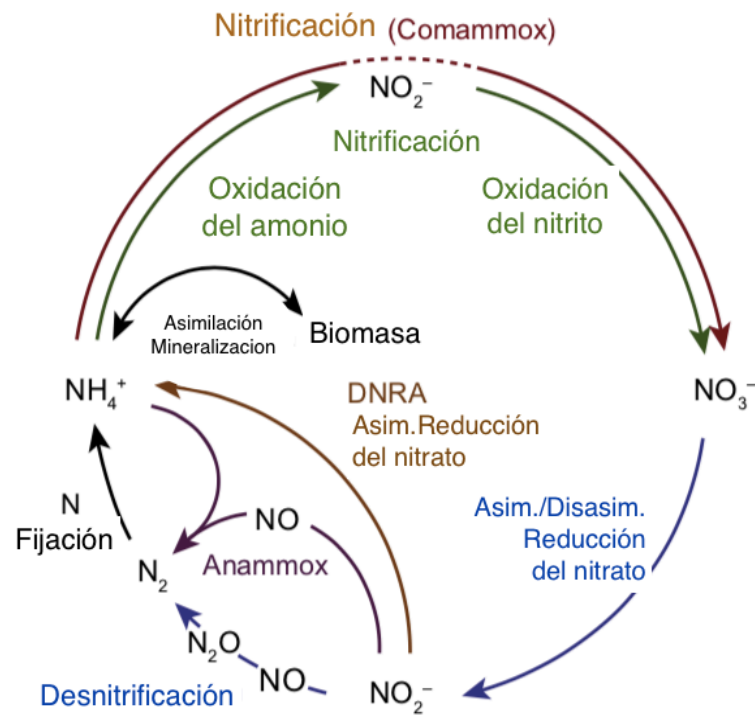


Figura 2. Ciclo del nitrógeno (Traducido de Daims et al., 2016)

Anammox, oxidación anaerobia del amonio; DNRA, reducción desasimilatoria del nitrito a amonio; asim., asimilatoria; disasim., desasimilatoria.

### 1.4.1 Alteraciones en el ciclo del nitrógeno

En la actualidad, el ciclo biogeoquímico del nitrógeno se ha visto alterado por los efectos de las actividades antropogénicas. El aumento de los focos de vertido y/o emisión de nitrógeno ha aumentado vertiginosamente en las últimas décadas. Estos incrementos son consecuencia de las actividades industriales, agrícolas y domésticas. Algunos efectos, de los que ya tenemos evidencias, son el aumento de la concentración de óxidos de nitrógeno en la atmósfera, contaminación de acuíferos por nitratos, toxicidad en el medio acuático y los problemas de eutrofización en las masas de agua y agotamiento del OD (Van Hulle *et al.*, 2010).

La eutrofización se puede definir como el incremento progresivo de productores primarios (cianobacterias, algas y plantas) debido a la alteración de alguno de los factores que limita su crecimiento: temperatura, luz o nutrientes. La eutrofización es un proceso natural consecuencia de la propia evolución del ecosistema, sin embargo, este proceso



puede ser acelerado por la acción antrópica. Los problemas de eutrofización más frecuentes suelen ser causados por la presencia de compuestos de nitrógeno y fósforo, ya que la disponibilidad de fuentes adecuadas de estos nutrientes a menudo limita la productividad primaria. El aporte de nutrientes origina un incremento de la productividad en todos los niveles de la cadena alimentaria, que tiene como consecuencia el consumo del OD del medio. La reducción del OD origina condiciones anóxicas, que provocan un empeoramiento progresivo de las características fisicoquímicas del agua. Algunas de las alteraciones causadas por la eutrofización son el incremento masivo de algas, el cambio de especies presentes y descenso de la diversidad del ecosistema, aparición de turbidez y color.

El control de la eutrofización se basa en reducir la carga de nutrientes aportados a las masas de agua y en llevar a cabo acciones encaminadas a paliar sus efectos sobre la misma. Los métodos para reducir el fósforo en las aguas residuales pueden ser: tratamientos biológicos convencionales, o bien tratamientos fisicoquímicos en los que se precipita el fósforo con agentes químicos. En el apartado 1.5 “Sistemas para la eliminación de nitrógeno en las aguas residuales” se explican con detalle los sistemas para la eliminación del nitrógeno en las corrientes de agua residual.

#### 1.4.2 El nitrógeno en las aguas residuales urbanas

El nitrógeno en las aguas residuales urbanas procede principalmente de la metabolización de las proteínas del cuerpo humano. Fundamentalmente aparece como nitrógeno orgánico, nitrógeno amoniacal y nitrógeno nítrico. El sumatorio de estos compuestos da como resultado el nitrógeno total (Tabla 1), su concentración habitual en las ARU está en torno a los 40 mg/L (Tchobanoglous *et al.*, 2003).

El nitrógeno amoniacal y el orgánico tienen mayor importancia desde el punto de vista de la depuración de aguas. Esto es debido a que provocan demandas de oxígeno en el medio acuático, por tratarse de formas susceptibles de oxidación natural. La suma de ambas fracciones se denomina nitrógeno Kjeldahl. El nitrógeno orgánico mayoritariamente procede de la materia celular, donde se encuentra principalmente en las proteínas y en la urea. Este es degradado a nitrógeno amoniacal por la actividad de las bacterias amonificantes. Su concentración habitual en las ARU suele variar entre 12 y 50 mg/L (Tchobanoglous *et al.*, 2003), mientras que en las aguas residuales industriales o los

lixiviados puede alcanzar concentraciones superiores a 2000 mg/L (Ganigué *et al.*, 2007). En disolución acuosa el nitrógeno amoniacal puede estar en forma de amoníaco (NH<sub>3</sub>) o en su forma ionizada (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) siendo esta última la forma predominante en las aguas residuales debido al pH característico de las mismas.

A las formas de nitrito y nitrato se les denomina nitrógeno nítrico. El nitrógeno nítrico aparece mayoritariamente como nitrato debido a que el nitrito es fácilmente oxidable a nitrato, y este es empleado como aceptor cuando el oxígeno es escaso, como suele ser habitual en los sistemas de alcantarillado debido a la fuerte demanda de oxígeno que ejerce la materia orgánica.

Tabla 1. Fraccionamiento del nitrógeno en las aguas residuales.

NITROGENO TOTAL (NT)			
N-KJELDAHL		N-NITRICO (<1%)	
N-ORGÁNICO (40%)	N-AMONIACAL (60%)	NITRITO	NITRATO
SUSPENDIDO	SOLUBLE		

### 1.5 SISTEMAS PARA LA ELIMINACIÓN DE NITRÓGENO EN LAS AGUAS RESIDUALES.

La eliminación del nitrógeno de las corrientes de agua residual es uno de los retos científicos y tecnológicos más importantes de la bioingeniería ambiental. En las últimas décadas se han desarrollado numerosas tecnologías que permiten reducir de forma eficiente su vertido medio y con ello los impactos derivados que genera. Estos procesos pueden ser tanto fisicoquímicos como biológicos.

Los métodos fisicoquímicos clásicos utilizados son (1) el intercambio iónico selectivo, donde el amonio es eliminado utilizando un intercambiador iónico como la zeolita natural; (2) el stripping, donde la eliminación del amonio se produce gracias al burbujeo del aire en el agua previa basificación del medio; (3) la cloración al breakpoint, donde el nitrógeno es oxidado a nitrógeno gaseoso con HClO. Estos métodos suelen utilizarse únicamente como tratamiento terciario en las EDAR debido a los elevados costos de operación que conllevan.

Los métodos biológicos para la eliminación de nitrógeno están ampliamente extendidos y han sido las tecnologías más utilizadas durante los últimos 50 años. En las EDAR el nitrógeno puede ser eliminado por diferentes vías. En primer lugar el amonio es empleado como nutriente para la síntesis de material celular. Se estima entre 10% y 30% el consumo de nitrógeno para el crecimiento de la biomasa en los sistemas de fangos activos. Si existe decantación primaria, esta alcanza a eliminar entre un 5%-10% del nitrógeno en forma de nitrógeno particulado. Pero estos porcentajes de eliminación siguen siendo insuficientes para el cumplimiento de los requisitos de vertido. Por esta razón se aplican otros procesos de depuración que permiten aumentar el grado de eliminación.

El proceso biológico más utilizado para este fin es el proceso de nitrificación-desnitrificación vía nitrato, mediante el cual el amonio es oxidado a nitrato (nitrificación) y posteriormente el nitrato es reducido a nitrógeno gas y otros compuestos nitrogenados (desnitrificación).

La nitrificación consiste en la oxidación secuencial del amonio a nitrato en presencia de oxígeno, este proceso se explica con detalle en el apartado 1.9 “Bioquímica del proceso de nitrificación”. Durante la desnitrificación el nitrato producido en la etapa anterior se reduce a nitrógeno gas bajo condiciones anóxicas. Los microorganismos más comunes relacionados con este proceso son *Thauera*, *Paracoccus*, *Azoarcus*, *Hyphomicrobium*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Bacillus*, que utilizan materia orgánica como fuente de carbono y energía, y el nitrato como aceptor final de electrones.

Existen diversos métodos biológicos para la eliminación del nitrógeno presente en las aguas residuales. Entre ellos destaca el proceso de nitrificación-desnitrificación por ser el más utilizado actualmente. En la Figura 3 se muestran las transformaciones que tienen lugar en el proceso de nitrificación-desnitrificación vía nitrato en las EDAR.

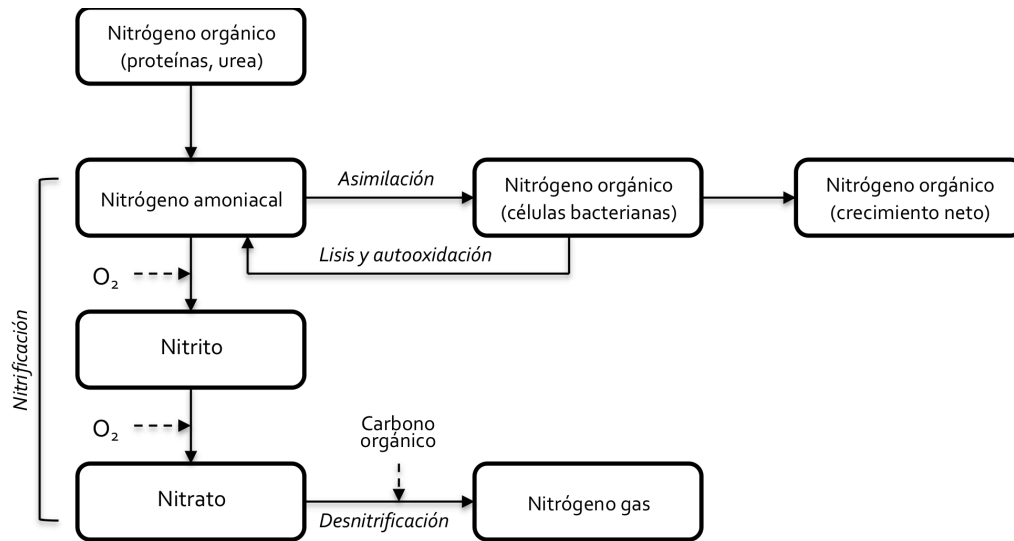


Figura 3. Transformaciones del nitrógeno en el proceso de nitrificación-desnitrificación vía nitrato. Adaptado de (Tchobanoglous *et al.*, 2003).

Este sistema se ha aplicado en diferentes tipos de procesos convencionales de depuración empleando diferentes configuraciones. El proceso de nitrificación-desnitrificación se ha aplicado tanto en sistemas de en cultivos de suspensión como los fangos activos, reactores de membrana (MBR), sistemas granulares y reactores secuenciales (SBR), como en sistemas con soporte fijo como los biodiscos, biofiltros o los contactores biológicos rotatorios.

Los organismos involucrados en la nitrificación y la desnitrificación tienen diferentes requisitos de oxígeno y metabólicos. Es por ello que, los procesos para la eliminación conjunta de nitrógeno y materia orgánica se realizan en reactores separados o en periodos de tiempo diferentes, para el establecimiento de condiciones aerobias (nitrificación) y anóxicas (desnitrificación). A continuación se resumen las principales características de los sistemas más habituales.

El sistema *Ludzack-Ettinger* (Figura 4) está compuesto por dos reactores en serie. El primer reactor, donde tiene lugar la desnitrificación, es anóxico. En esta etapa se utiliza el carbono presente en el agua residual afluyente como sustrato (donador de electrones) y los nitratos como aceptores de electrones. En este proceso se degrada la mayor parte de la materia orgánica y el nitrito es reducido a nitrógeno gas (desnitrificación). El segundo

reactor se mantiene en condiciones aerobias y en él se produce principalmente la oxidación del nitrógeno amoniacal a nitrato (nitrificación).

El sistema *Ludzack-Ettinger* modificado (Figura 5) mantiene la misma configuración que el anterior, pero se le añade una recirculación interna. Esta corriente permite enviar los nitratos generados en la zona aerobia a la zona anóxica mejorando los rendimientos del proceso de desnitrificación. En ambas configuraciones los fangos sedimentados en el decantador secundario son recirculados al reactor anóxico (recirculación externa).

El esquema Wuhrman (Figura 6) es similar al sistema *Ludzack-Ettinger*, pero en este caso el reactor aerobio precede al reactor anóxico. Esta configuración aumenta los requerimientos de oxígeno en la primera etapa, ya que en el esquema *Ludzack-Ettinger* la materia orgánica es eliminada en la etapa anóxica, mientras que en esta configuración lleva asociada un consumo de oxígeno. Además provoca que, en algunas ocasiones, sea necesaria una fuente de carbono externa para el proceso de desnitrificación posterior.

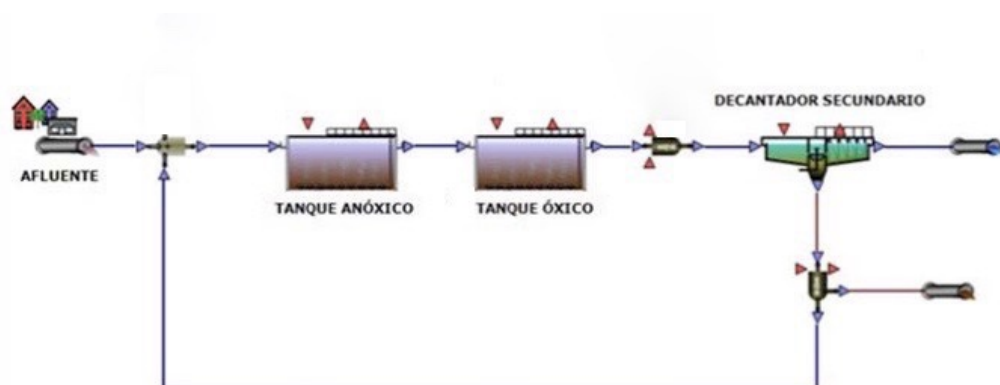


Figura 4. Esquema *Ludzack-Ettinger*

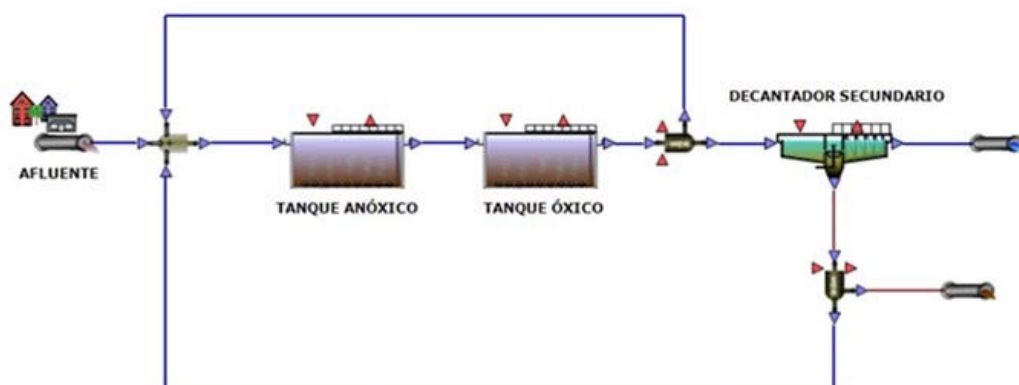


Figura 5. Esquema *Ludzack-Ettinger* modificado

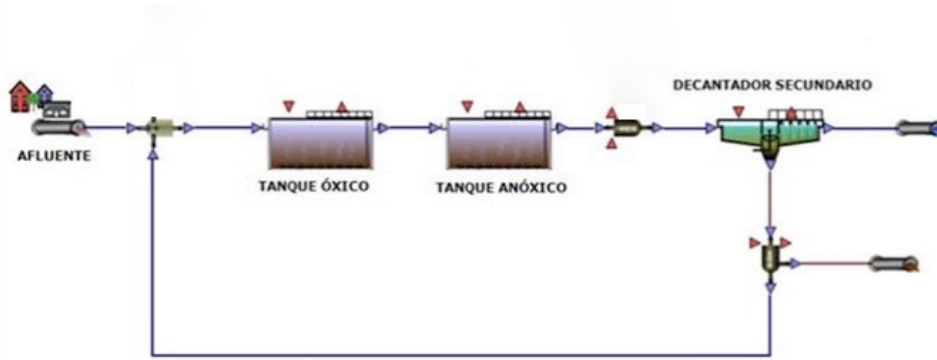


Figura 6. Esquema Wuhrman

Para conseguir que el proceso de nitrificación y desnitrificación ocurra en un mismo reactor el sistema convencional de fangos activos puede ser operado en ciclos. La operación en ciclos consiste en la alternancia de las condiciones aerobias y anóxicas en el mismo reactor durante periodos variables de tiempo. Estos sistemas permiten obtener elevados rendimientos de eliminación con aportes menores de oxígeno que las configuraciones basadas en varios reactores (Mota *et al.*, 2005), incluso para sistemas con altas cargas de nitrógeno (Cheng y Lui, 2001). En estos sistemas la relación aireación/no aireación es un factor clave de operación. De manera convencional, los ciclos anóxicos suelen durar 1/3 de los ciclos óxicos, no superando los 60 minutos de duración.

El sistema IFAS (Integrated fixed-film activated sludge) es una combinación de cultivo en suspensión y cultivo soporte fijo. En esta configuración se añade un medio fijo al reactor aerobio convencional de fangos activos. Los medios fijos pueden ser tanto estáticos o móviles, así como también pueden estar suspendidos. El objetivo de esta configuración es mantener una población nitrificante permanente en medio fijo que no será eliminada con la purga de fangos en exceso. De esta manera la nitrificación se produce independientemente del TRC del cultivo suspendido, ya que este no es eliminado con la purga de fangos. Este sistema permite aumentar la capacidad de tratamiento y ratio de nitrificación de los sistemas de fangos activos existentes, en lugar de aumentar el tamaño de la planta. Estas condiciones hacen que este sistema sea particularmente beneficioso para las aguas residuales a baja temperatura (10-15 °C).

Otro de los sistemas que permiten realizar la nitrificación-desnitrificación en un mismo reactor son los sistemas aerobios granulares (Figura 7). En estos sistemas el proceso

de fangos activos se opera para favorecer las condiciones de formación de partículas de rápida sedimentación. En estas partículas, denominadas gránulos, se agrupan las poblaciones de microorganismos heterótrofos, nitrificantes, desnitrificantes y acumuladores de fósforo (PAO). Las ventajas de estos sistemas son la rápida sedimentación y que permite mayores concentraciones de sólidos del reactor y, por tanto, disminuyen las necesidades de espacio de los sistemas convencionales.

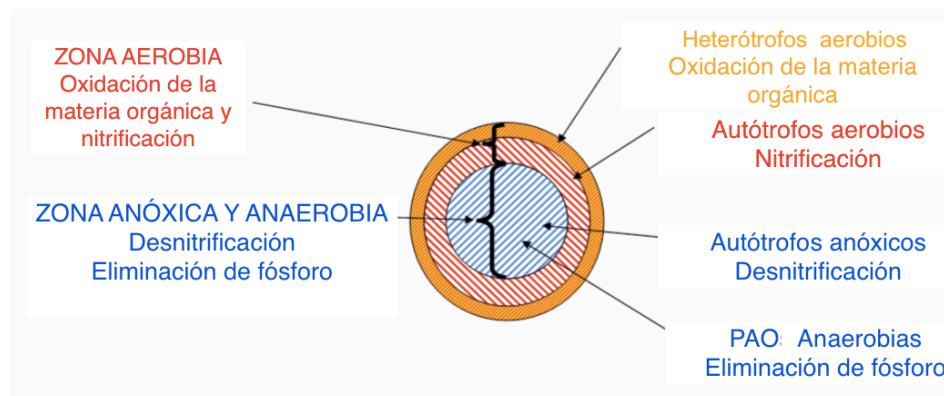


Figura 7. Representación esquemática de las capas estructurales de los gránulos aerobios.

El proceso de nitrificación-desnitrificación vía nitrato ha sido ampliamente utilizado en los sistemas de tratamiento de ARU por su elevada eficiencia en el tratamiento de efluentes con elevadas concentraciones de materia orgánica. Sin embargo, en corrientes pobres en materia orgánica y elevadas concentraciones de amonio la nitrificación y desnitrificación autótrofa resulta una vía más eficiente (González-Martínez *et al.*, 2011). Estas técnicas están basadas en la versatilidad de los microorganismos del ciclo del nitrógeno. Su desarrollo, producido principalmente en los últimos 30 años, ha sido motivado por las exigencias de vertido y la evolución de las técnicas moleculares. Estos avances han permitido aumentar el rendimiento de las instalaciones de eliminación biológica de nitrógeno, principalmente de aquellas que tratan efluentes con elevadas concentraciones de amonio. Estos sistemas están basados en la nitrificación parcial y la oxidación anaerobia del amonio.

Durante la nitrificación parcial el nitrógeno amoniacal se oxida parcialmente hasta nitrito y la formación de nitrato es inhibida forzando la desnitrificación vía nitrito. Estos sistemas utilizan temperaturas elevadas para favorecer en mayor medida el crecimiento de

las bacterias oxidantes del amonio (BOA) (Hellings *et al.*, 1998). Son sistemas adecuados para el tratamiento de efluentes con concentraciones de nitrógeno superiores a los 500 mgN/L. Su temperatura óptima de operación está en torno a los 35° y su pH entre 6.8 y 7.2.

El sistema de nitrificación parcial se combina frecuentemente con la oxidación anaerobia del amonio. Las bacterias anammox (eliminación anaerobia del amonio) eliminan el nitrógeno autótrofamente mediante la combinación de amonio y nitrito para formar nitrógeno gas. Para ello el nitrito es reducido a nitrógeno gas utilizando el nitrógeno amoniacal como dador de electrones (Mulder, 1992; van Loosdrecht y Jetten, 1998). Esta reacción es principalmente llevada a cabo por bacterias de los géneros *Brocadia*, *Kuenenia*, *Anammoxoglobus*, *Jettenia* (origen agua dulce) y *Scalindua* (origen marino) (Jetten *et al.*, 2009).

En los sistemas de nitrificación parcial los requerimientos de oxígeno y las cargas orgánicas son menores que en la nitrificación-desnitrificación vía nitrato. Estas condiciones permiten obtener mejores rendimientos de eliminación de nitrógeno para el mismo aporte de oxígeno y para la misma carga orgánica. La combinación del proceso de nitrificación parcial y el proceso anammox posibilita la conversión directa del nitrógeno amoniacal en nitrógeno gaseoso. Este proceso permite acortar el camino para la eliminación completa de nitrógeno minimizando los costes de aireación del proceso convencional. Sin embargo, el establecimiento de un metabolismo anammox estable y la inhibición de las bacterias oxidantes del nitrito (BON), requiere de condiciones de operación muy precisas, como la relación estequiométrica amonio/nitrito, control de la concentración de OD y temperatura. Otro de los inconvenientes a resolver para la aplicación de estas técnicas son las diferencias fisiológicas de los dos grupos de bacterias involucrados (BOA y anammox). Para salvar estos inconvenientes se han desarrollado diferentes sistemas. La configuración más habitual es la realización secuencial del proceso de nitrificación parcial y anammox en reactores separados. Este enfoque de dos pasos ha demostrado ser eficiente en varias instalaciones a escala real (Lackner *et al.*, 2014). En el proceso CANON (*Completely Autotrophic Nitrogen Removal over Nitrite*) las BOA coexisten con las bacterias anammox en un solo reactor (Slijkens *et al.*, 2002). Para ello se establecen unas condiciones limitadas de oxígeno en el reactor que desfavorecen el crecimiento de las BON. El principal inconveniente de este



proceso son los elevados requerimientos de control necesarios para su operación (Kalyuzhnyi *et al.*, 2006a).

Una de las primera configuraciones desarrolladas para la aplicación de esta tecnología fue el proceso OLAND (Oxigen-Limited Autotrophic nitrification-denitrification). Este proceso consiste en un reactor aerobio con condiciones de oxígeno limitadas, y provisto de un contactor biológico rotativo, el cual contiene una estructura de biopelículas (Siegrist *et al.*, 1998). En este proceso el amonio es parcialmente oxidado a nitrito por BOA en la capa de biopelícula aerobia. Posteriormente el amonio y el nitrito se difunden en la capa anóxica más profunda de la biopelícula, donde el nitrito es usado como aceptor de electrones por las bacterias anammox.

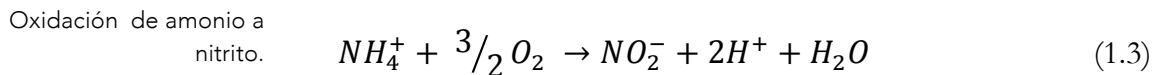
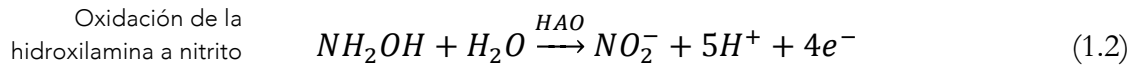
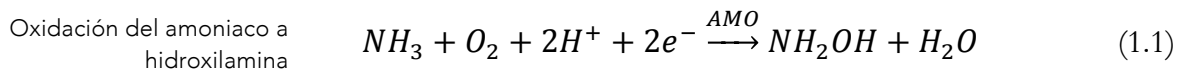
Se han desarrollado otros sistemas que no requieren de una producción de nitrito en condiciones aerobias. Uno de ellos es el proceso DEAMOX (Denitrifying Ammonium Oxidation) (Kalyuzhnyi *et al.*, 2006b). En este proceso el sulfuro se utiliza como dador de electrones para la generación de nitrito a partir de nitrato dentro de un biofilm anaerobio. Este proceso presenta varios inconvenientes, como la participación de demasiados reactores y la presencia de sulfuro, que puede inhibir la actividad de la población de anammox (Russ *et al.*, 2014).

## 1.6 BIOQUÍMICA DEL PROCESO DE NITRIFICACIÓN

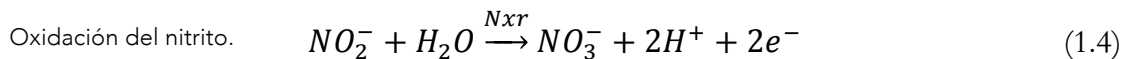
La nitrificación consiste en la oxidación biológica secuencial del amonio a nitrato catalizada principalmente por organismos procariontas quimiolitautótrofos (Prosser, 1989). Estos organismos emplean carbono inorgánico para la síntesis celular, nitrógeno inorgánico para la obtención de energía y oxígeno como aceptor de electrones.

Este proceso puede ser llevado a cabo conjuntamente por los organismos oxidantes del amonio y los organismos oxidantes del nitrito, o bien de manera individual por los organismos commamox (oxidación completa del amonio), recientemente descubiertos (Daims *et al.*, 2015). También existen bacterias heterótrofas capaces de realizar la nitrificación, sin embargo su contribución a la eliminación del amonio suele ser despreciable, excepto en condiciones de pH extremas.

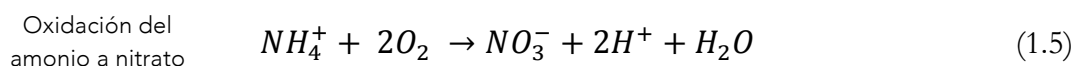
En el primer paso de la nitrificación los organismos oxidantes del amonio transforman el amonio a nitrito. Son necesarias dos enzimas para catalizar este proceso: la amonio monooxigenasa (AMO) asociada a la membrana plasmática (Hollocher *et al.*, 1981), que es la responsable de la oxidación del amonio a hidroxilamina y la oxidorreductasa hidroxilamina (HAO) asociada al periplasma (Olson y Hooper, 1983), que controla la oxidación de la hidroxilamina a nitrito. Las enzimas AMO y HAO son codependientes, ya que generan el sustrato y los electrones entre sí, respectivamente. Las ecuaciones 1.1, 1.2 y 1.3 describen las reacciones que tienen lugar en el proceso de oxidación del amonio.



El nitrito es posteriormente oxidado a nitrato por las BON (Bock *et al.*, 1992). Esta reacción es catalizada por la enzima nitrito oxidoreductasa (NXR) (Bock y Wagner, 2001). Esta enzima se localiza en la membrana celular interna en *Nitrobacter*, *Nitrococcus* y *Nitrolancea* (Spieck *et al.*, 1996; Sorokin *et al.*, 2012). Para el resto de BON se localiza en el espacio periplásmico asociada a la superficie de la membrana celular externa (Spieck *et al.*, 1998; Lücker *et al.*, 2010). La ecuación 1.4 describe la reacción de oxidación del nitrito a nitrato.

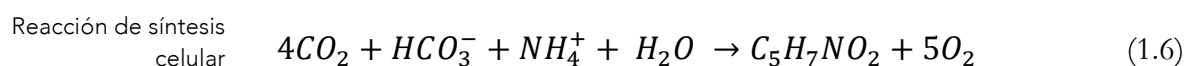


La reacción completa de oxidación del amonio a nitrato viene dada por la expresión 1.5.



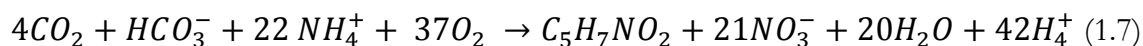
En el balance total de la reacción se produce energía que es utilizada por los microorganismos para sus funciones de crecimiento y mantenimiento celular.

Una parte del nitrógeno amoniacal es empleada por los microorganismos como nutriente para la síntesis de material celular. La cantidad de nitrógeno utilizada para este fin será equivalente a la estequiometría necesaria para el crecimiento de la biomasa producida, independientemente del esquema de proceso que se utilice. Si consideramos la fórmula química de la biomasa como  $C_5H_7NO_2$  esta reacción puede expresarse según la ecuación 1.6.



La ecuación 1.7 describe la reacción global del proceso de nitrificación.

Proceso de nitrificación



En las relaciones estequiométricas de la reacción global del proceso de oxidación del amonio, se observa que el incremento de biomasa por cada mol de amonio oxidado es relativamente bajo. Por cada mol de amonio oxidado en el proceso se consumen 7,14 g de  $CaCO_3$  y 4,57 g de  $N-NH_4^+$ . El coeficiente típico de producción de biomasa por gramo de nitrógeno oxidado ( $Y_A$ ) es 0,1 g de biomasa/g de nitrógeno. La baja energía obtenida en la oxidación del amonio y del nitrito hace que tanto las BOA como las BON tengan bajos ratios de crecimiento.

## 1.7 BACTERIAS DEL PROCESO DE NITRIFICACIÓN

Los organismos responsables del proceso de nitrificación han sido objeto de estudio desde su descubrimiento por Sergei Winogradsky en 1890. Debido al importante papel de la nitrificación en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno, tanto en el medio ambiente natural, como en los sistemas de tratamiento de aguas residuales, los

investigadores han estado tratando de comprender la ecofisiología de los microorganismos responsables de este proceso hasta día de hoy.

Las bacterias nitrificantes, son organismos quimiolitautótrofos a expensas de compuestos reducidos de nitrógeno inorgánico y respiradores aerobios por definición. Generalmente se caracterizan por ser bacterias de crecimiento lento y poseer sistemas membranosos internos complejos. Estas bacterias están ampliamente distribuidas en suelos y agua y suelen ser muy abundantes en hábitats con elevados niveles de amonio y pH alcalino. Actualmente los organismos nitrificantes conocidos se encuentran englobados dentro de pocos linajes filogenéticos y únicamente escasas poblaciones son las que dominan habitualmente en las EDAR. En su mayoría pertenecen al filo *Proteobacteria*. Las BOA y las BON realizan una simbiosis mutualista; el nitrito producido por las BOA es el sustrato de las BON, el cual puede llegar a ser tóxico, ya que su acumulación puede llegar a inhibir el crecimiento de BOA. (Daims *et al.*, 2006).

Tradicionalmente el proceso de nitrificación había sido considerado un paso de dos etapas donde el amonio era oxidado a nitrito a por las BOA y posteriormente a nitrato por las BON. A pesar de ello, durante mucho tiempo, se había especulado sobre la existencia de organismos capaces de realizar la oxidación completa del amonio a nitrato (Costa *et al.*, 2006), debido a que energéticamente es una reacción más favorable. En 2015, el descubrimiento del metabolismo comammox, en el que la oxidación del amonio a nitrato es llevada a cabo por un único organismo (*Nitrospira*) (Daims *et al.*, 2015; van Kessel *et al.*, 2015), confirmó estas especulaciones.

La capacidad de nitrificación también ha sido observada en algunos organismos heterótrofos. Representantes de los géneros *Pseudomonas* y *Paracoccus* han sido detectados en reactores a escala de laboratorio con un sistema de tratamiento aerobio granular y elevadas cargas de amonio (Cyzdik-Kwiatkowska, 2015). Los géneros *Comamonas*, *Thauera*, *Paracoccus* y *Azoarcus* también fueron detectados en sistemas de tratamiento de aguas residuales industriales con altas cargas de amonio (Wang *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2015).

A pesar de ello, la nitrificación autótrofa sigue siendo el proceso predominante en los sistemas del tratamiento de aguas residuales, incluso en sistemas con elevadas relaciones C/N (Kim *et al.*, 2005).

### 1.7.1 Las baterías oxidantes de amonio

La oxidación del amonio puede llevarse a cabo mediante procesos aerobios y anaerobios. Los principales representantes de estos procesos en las EDAR son las BOA, las arqueas oxidantes del amonio (AOA) y bacterias anammox respectivamente. Como se ha comentado anteriormente, se sabe de la existencia de bacterias heterótrofas que pueden llevar a cabo el proceso, aunque su participación no es significativa en los procesos de depuración.

Las BOA junto con las AOA son las responsables de la primera etapa del proceso de nitrificación aerobia en las EDAR. La mayoría de estos microorganismos obtienen la energía para su crecimiento de la oxidación aerobia del amonio. Sin embargo, algunos de ellos pueden crecer tanto en condiciones aerobias, como anaerobias en función de la concentración de oxígeno del medio (Schmidt *et al.*, 2003). En condiciones aerobias, el producto principal de su metabolismo es el nitrito, mientras que el dinitrógeno, el nitrito y el óxido nítrico se producen en condiciones anóxicas.

Las BOA conocidas (Figura 8) que intervienen en los procesos aerobios pertenecen al filo *Proteobacteria*, dentro del cual se engloban en las clases *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* (Purkhold *et al.*, 2000). Las betaproteobacterias como *Nitrosomonas* y *Nitrospira* (Teske *et al.*, 1994), son las especies más comunes en los procesos de tratamiento de aguas residuales. Las gammaproteobacterias, en las cuales encontramos las especies *Nitrosococcus oceani* y *Nitrosococcus halophilus* (Koops *et al.*, 1990; Bothe *et al.*, 2000), son halófilas y tienen escasa presencia en los procesos convencionales de depuración.

Las proteobacterias están ampliamente distribuidas en ambientes naturales y artificiales. En base a su morfología celular las BOA comprenden 5 géneros: *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosovibro* y *Nitrosolobus*, pero estudios posteriores basados en la homología del gen 16S rRNA no dieron resultados significativos que justifiquen esta diferenciación, por lo que se propuso la agrupación de estos dos últimos en el género *Nitrosomonas* (Head *et al.*, 1993; Purkhold *et al.*, 2003). Así mismo el género *Nitrosococcus* se encuentra estrechamente relacionado con el orden *Nitrosomonadales* (Thandar *et al.*, 2016).

En la mayoría de EDAR la oxidación de amonio está asociada a betaprotobacterias del género *Nitrosomonas* (Purkhold *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2011b). Este género contiene al

menos seis linajes distintos (Purkhold *et al.*, 2003): *Nitrosomonas eutropha* - *Nitrosomonas europaea*, *Nitrosomonas oligotropha* - *Nitrosomonas ureae*, *Nitrosomonas communis*, *Nitrosomonas marina*, *Nitrosomonas cryotolerans* y *Nitrosomonas* sp. La distribución de las diferentes especies de *Nitrosomonas* parece depender del sistema de tratamiento y de las variables ambientales. Mientras que en algunos reactores domina una sola especie (Juretschko *et al.*, 1998) otros sistemas pueden contener hasta 5 especies diferentes (Daims *et al.*, 2001b; Gieseke *et al.*, 2003). La mayoría de los miembros del linaje *N. europaea* son halotolerantes o moderadamente halófilas y tienen preferencia por las elevadas concentraciones de sustrato. Estudios en plantas piloto y a escala real sitúan a *Nitrosococcus mobilis* (dentro del linaje *N. europaea*) en reactores con elevadas concentraciones de amonio y sal (Juretschko *et al.*, 1998), al igual que *N. europaea*, que aparece con altas concentraciones de amonio (Tan *et al.*, 2008) y suelen ser dominantes en reactores que tratan aguas residuales salinas (Park *et al.*, 2009). Este linaje es bien conocido por su gran afinidad por el amonio, y las especies que lo constituyen han sido reconocidas como las principales especies oxidantes del amonio en sistemas con elevadas concentraciones de amonio (González-Martínez *et al.*, 2012). Esto es debido a la mayor afinidad de estos grupos por el amonio respecto a los valores de afinidad de otras BOA (Martens-Habbena *et al.*, 2009). Sin embargo, los miembros del linaje de *N. oligotropha* suelen ser las especies mayoritarias en las EDAR con bajos niveles de amonio (Harms *et al.*, 2003; Limpiyakorn *et al.*, 2005).

La oxidación autótrofa de amonio también se produce en el dominio *Archaea*. Han sido numerosos los estudios acerca de la presencia de organismos del dominio *Archaea* en suelos y océanos (Venter *et al.*, 2004; Schleper *et al.*, 2005), confirmándose finalmente que estos organismos juegan un papel importante en la nitrificación en ecosistemas marinos y terrestres (Leininger *et al.*, 2006; Beman *et al.*, 2008). Así mismo las AOA del filo *Crenarchaeota* (Parck *et al.*, 2006; Wells *et al.*, 2009) y *Thaumarchaeota* (Spang *et al.*, 2010) han sido detectadas en EDAR tratando aguas residuales industriales (Mußmann *et al.*, 2011). Numerosos estudios han evaluado la abundancia de estos microorganismos y su contribución a la eliminación del amonio, tanto en sistemas naturales como antropogénicos (Gao *et al.*, 2014; Roy *et al.*, 2017; Pan *et al.*, 2018). Estudios como el de Srithep *et al.* (2018) mediante el marcaje con C<sup>13</sup>, confirman la contribución de ambos grupos a la oxidación del amonio. Los resultados obtenidos en estos estudios son muy dispares; algunos estudios

muestran la ausencia total de AOA (Mußmann *et al.*, 2011; Yu y Zhang, 2012), una contribución mínima o igual a las BOA (Wells *et al.*, 2009; Yapsakli *et al.*, 2011), o un predominio de AOA sobre BOA (Kayee *et al.*, 2016a; Bai *et al.*, 2012; Pan *et al.*, 2018). Hasta el momento no se puede extraer una conclusión clara de estos estudios sobre el papel de AOA en la oxidación del amonio, se necesitan más estudios para determinar en qué circunstancias desempeñan un papel importante (Ferrera y Sánchez, 2016).

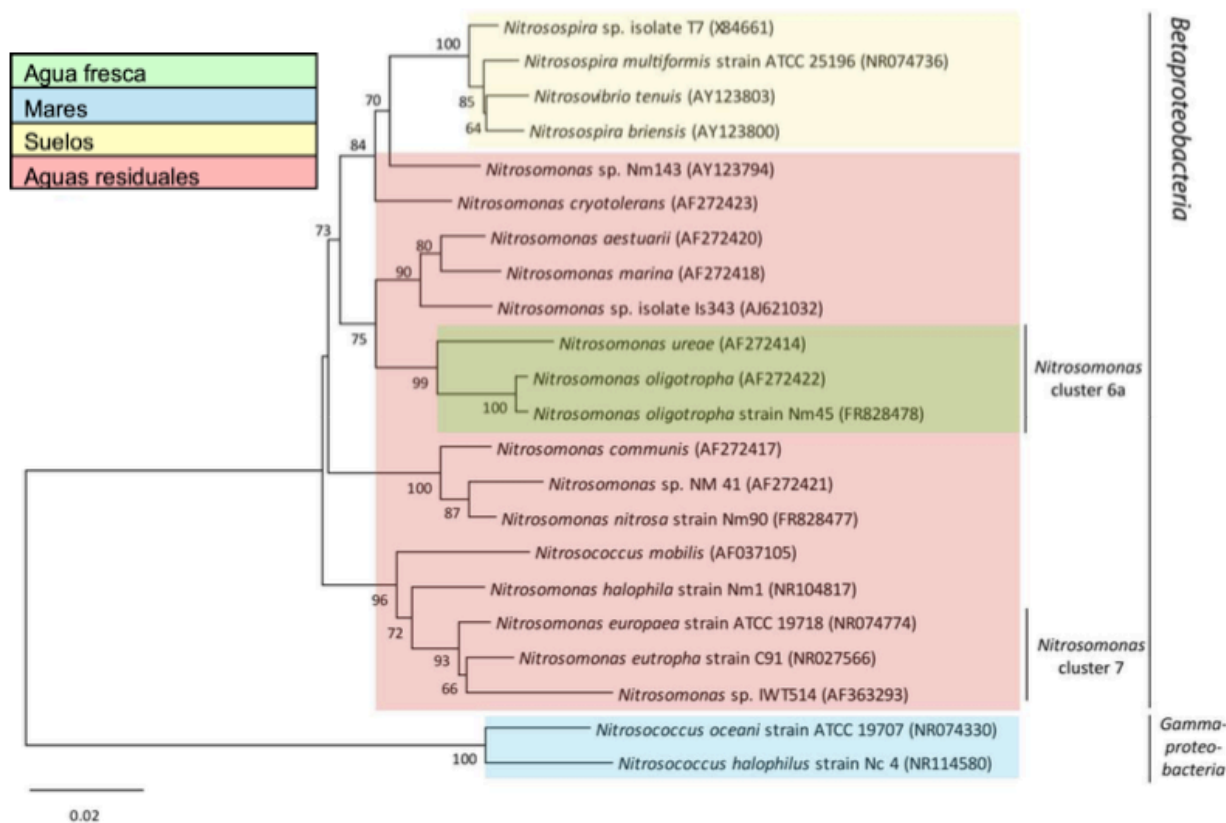


Figura 8. Principales bacterias oxidantes del amonio. Adaptado de Sánchez (2015).

Las arqueas oxidantes de amonio son más pequeñas que las BOA, tienen una relación superficie-volumen más amplia (Martens-Habbena y Stahl, 2011), una afinidad más alta por el amonio (Martens-Habbena *et al.*, 2009) y son más eficientes energéticamente que BOA (Konneke *et al.*, 2014), lo cual ayuda a definir sus diferentes nichos en el medio ambiente acuático.

### 1.7.2. Las bacterias oxidantes del nitrito

La oxidación aerobia del nitrito es catalizada por bacterias autótrofas de crecimiento lento, las cuales son un grupo filogenéticamente más diverso que las BOA. La mayoría de los linajes de BON son muy versátiles y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (ecosistemas marinos, terrestres y artificiales como las EDAR) (Figura 9). A menudo en las EDAR, tanto en flóculos como en biopelículas, encontramos las BOA y BON en una misma área, lo que refleja la simbiosis de ambos grupos funcionales (Maixner *et al.*, 2006). En general las BON son microorganismos muy difíciles de aislar de los hábitats naturales. Las especies descritas se encuentran dentro de los filos, *Nitrospinae* (Watson y Waterbury, 1971), *Nitrospirae* (Ehrich *et al.*, 1995), *Chloroflexi* (Sorokin *et al.*, 2012) y *Proteobacteria*, dentro del cual existe la mayor diversidad de BON.

Asociadas a ambientes marinos, encontramos los géneros *Nitrococcus* (Watson y Waterbury, 1971) en la clase *Gammaproteobacteria* y el género *Nitrospina*. Este género fue asignado provisionalmente dentro de la clase *Deltaproteobacteria* (Teske *et al.*, 1994), aunque esta afiliación fue cuestionada debido a su dificultad de clasificarla únicamente con análisis filogenéticos basados en el gen 16S rRNA (Schloss y Handelsman, 2004). Estudios posteriores proponen la inclusión de este género dentro de un nuevo filo denominado *Nitrospinae* (Lücker *et al.*, 2013; Spieck *et al.*, 2014). Esta bacteria parece ser la especie dominante en la oxidación del nitrito en los ecosistemas marinos (Lücker *et al.*, 2013) y también ha aparecido asociada a ambientes con elementos radioactivos (Weidler *et al.*, 2007).

*Nitrobacter* spp., dentro de las alfaproteobacterias, ha sido detectada tanto en hábitats acuáticos como terrestres. Algunas de las subespecies descritas han sido *Nitrobacter winogradskyi*, *Nitrobacter hamburgensis*, *Nitrobacter vulgaris* y *Nitrobacter alkalicus*. Su temprano descubrimiento hizo que este grupo se considerara predominante en los sistemas de tratamiento de aguas residuales (Hence *et al.*, 1997). La facilidad con la que se pueden obtener cultivos puros de este género, ha favorecido que sus constantes cinéticas hayan sido empleadas como características generales de las BON. *Nitrobacter* spp. se caracteriza por poseer bajos tiempos de reproducción y baja afinidad por el nitrito, aunque pueden llegar a alcanzar rendimientos de conversión de nitrito más altos que *Nitrospira* spp. y *Nitrotoga* sp. (Nowka *et al.*, 2015). Su potencial de crecimiento mixotrófico y



quimioorganotrófico (Smith y Hoare, 1968; Steinmüller y Bock, 1976) e incluso anaeróbicamente a través de la reducción de nitrato (Freitag *et al.*, 1987), le da a *Nitrobacter* spp. un metabolismo versátil, que puede compensar su baja afinidad por el nitrito.

El género *Nitrotoga* en la clase *Betaproteobacteria* está ampliamente distribuido en ambientes fríos (Alawi *et al.*, 2007; White *et al.*, 2012). Su temperatura de incubación óptima está en torno a los 17 °C, en contraste con las temperaturas de incubación más altas de otras BON (28 a 37 °C). Este género ha sido detectado en suelos (Alawi *et al.*, 2007), sistemas de agua dulce (White *et al.*, 2012) y sistemas de fangos activos (Alawi *et al.*, 2009; Lücker *et al.*, 2014). La especie más representativa de este género es *Nitrotoga ártica*. Las bacterias de este género se caracterizan por una actividad máxima baja (o tasa de crecimiento) y afinidades de sustratos elevadas. El valor de la constante de semisaturación de *Nitrotoga* sp. conecta los rangos de afinidad de *Nitrospira* spp. y *Nitrobacter* spp. e indica una mejor adaptación de este género a concentraciones bajas de nitrito.

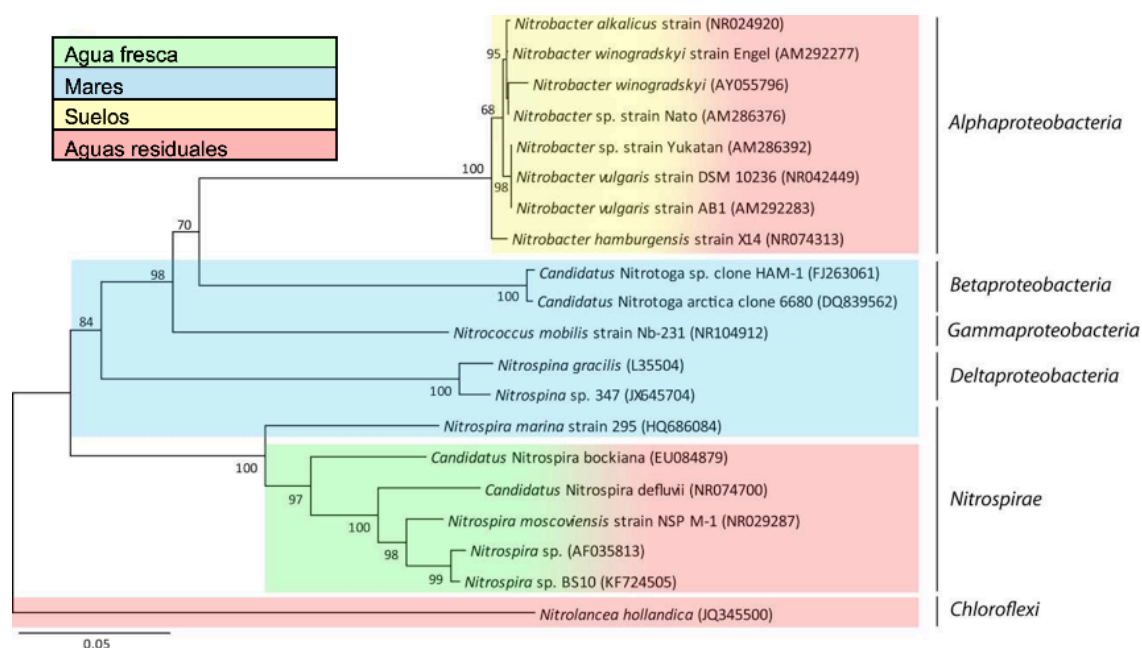


Figura 9. Principales bacterias nitrito oxidantes. Adaptado de Sánchez (2015).

El género *Nitrospira*, se reconoce como el más extendido en el medio ambiente, representando un grupo monofilético dentro del filo *Nitrospirae*. Es un género diverso y comprende al menos seis sublinajes filogenéticos diferentes (Lücker *et al.*, 2010).

Han sido descritas como bacterias de difícil cultivo y únicamente pocas especies han podido ser cultivadas y aisladas. Los primeros cultivos de *Nitrospira* (Watson *et al.*, 1986; Ehrich *et al.*, 1995) y su posterior detección en plantas a escala real, mediante técnicas moleculares no dependientes de cultivo, confirmaron que *Nitrospira* era un género clave en este proceso de oxidación del nitrito (Juretscho *et al.*, 1998; Daims *et al.*, 2001a, Spieck *et al.*, 2006). *Nitrospira* spp. se ha detectado comúnmente en suelos oligotróficos (Swanner *et al.*, 2011) y aguas dulces con concentraciones de nitrito por debajo del límite de detección (Mußmann *et al.*, 2013). La primera especie descrita fue *Nitrospira marina* aislada del agua del mar (Watson *et al.*, 1986), seguida por *Nitrospira moscoviensis*, la cual fue aislada a partir de un tubo de hierro de un sistema de calefacción en Moscú (Ehrich *et al.*, 1995) y también se asocia a aguas dulces.

El género *Nitrospira*, al igual que *Nitrotoga*, se caracteriza por una actividad máxima baja y afinidades de sustratos elevadas. Es por ello que las bacterias *Nitrospira* están adaptadas para vivir bajo una limitación significativa del sustrato. Estas características, junto con su NXR periplásmica energéticamente favorable (Lücker *et al.*, 2010) explican su competitividad en los sistemas de fangos activos.

Las diferencias en la cinética de crecimiento entre las BON se pueden describir en términos de estrategias K y r (Schramm *et al.*, 1999; Andrews y Harris, 1986). El género *Nitrospira* (estratega K) se caracteriza por una actividad máxima baja (o tasa de crecimiento) y afinidades de sustratos elevadas, mientras que *Nitrobacter* (estratega r) tienen una capacidad de oxidación de nitritos máxima relativamente alta y baja afinidad por el sustrato. Estas estrategias opuestas fueron confirmadas por enfoques biotecnológicos en varios reactores (Kim *et al.*, 2006; Blackburne *et al.*, 2007).

Hasta el momento las afinidades de nitrito determinadas no permiten diferenciación entre las cepas de *Nitrospira* de diferentes linajes filogenéticos, aunque sí se han encontrado diferencias respecto a sus tasas máximas de actividad. En el estudio de Nowka *et al.* (2015) se observó que *Candidatus Nitrospira defluvii* fue más competitivo, tanto a concentraciones bajas como a concentraciones altas de nitrito, que la cepa del mismo género BS10. Este tipo de observaciones pone de manifiesto que existen otros factores selectivos, además de la concentración de sustrato, que promueven el crecimiento de las diferentes especies en los sistemas de tratamiento de aguas residuales.

Recientemente, algunas especies que pertenecen al linaje II del género *Nitrospira* han sido identificadas como bacterias comammox, que realizan la nitrificación completa de amoníaco a nitrato (Daims *et al.*, 2015; van Kessel *et al.*, 2015).

El linaje II de *Nitrospira* se distribuye ampliamente en ecosistemas naturales y artificiales. A diferencia de los miembros de *Nitrospira* que oxidan el nitrito, su genoma alberga un conjunto completo de los tres genes que codifican las enzimas nitrificantes, es decir, los genes para la codificación de las enzimas AMO y HAO, para la oxidación de amonio y la enzima NXR para la oxidación del nitrito. Curiosamente los genes amoA de *Nitrospira* son filogenéticamente diferentes a los de las BOA convencionales (van Kessel *et al.*, 2015). Algunas especies de este linaje identificadas en sistemas fangos activos han sido *Nitrospira inopinata*, *Nitrospira nitrificans* y *Nitrospira nitrosa* (Wang *et al.*, 2018).

El metabolismo comammox se propuso teóricamente sobre la base de que la nitrificación completa produciría más energía que el proceso de nitrificación separado en dos etapas, y las bacterias comammox podrían lograr un crecimiento competitivo en flóculos microbianos o biopelículas donde los sustratos están limitados (Costa *et al.*, 2006).

Son escasos todavía los estudios que han explorado su distribución ambiental y su importancia ecológica en referencia a su capacidad de oxidación del amonio (Wang *et al.*, 2018; Zheng *et al.*, 2019). La detección de esta bacteria se ha limitado a algunos estudios con secuenciación por metagenómica (Chao *et al.*, 2016; Annavajhala *et al.*, 2018). Las commammox *Nitrospira* detectadas hasta el momento se han limitado a ambientes oligotróficos (Pinto *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017). Su abundancia y su contribución a la eliminación del amonio no ha sido esclarecida en la hasta la fecha. En el estudio de Fan *et al.* (2017) se encontró que la abundancia de commammox *Nitrospira* fue más baja que la de AOA y BOA en una EDAR convencional, mientras que commammox *Nitrospira* fue más abundante que las BOA en un sistema donde no se encontraron AOA (Pjevac *et al.*, 2017).

### 1.7.3 Principales factores que afectan a la actividad y la abundancia de las bacterias nitrificantes en las EDAR

Las bacterias nitrificantes, y especialmente la BOA, son sensibles a los compuestos tóxicos en las aguas residuales y a la variación de las condiciones ambientales y los

parámetros operacionales de la EDAR. La alteración de estas condiciones puede inhibir total o parcialmente la actividad nitrificante y además modificar la estructura poblacional de estas bacterias. Comprender los impactos y los mecanismos de los diversos factores que modelan la estructura de la comunidad nitrificante es de gran importancia para su regulación y para la mejora de los rendimientos del proceso de nitrificación.

Las condiciones variables de una EDAR requieren una respuesta flexible de la comunidad microbiana, que puede lograrse mediante la presencia de bacterias nitrificantes con diferentes adaptaciones a la temperatura o concentraciones de nitrito (Kruse *et al.*, 2013). La estabilidad funcional y los elevados rendimientos no están necesariamente acompañados de una comunidad microbiana estable. La existencia de una dinámica poblacional diversa, frente a la presencia de un único linaje de un grupo funcional es una manera efectiva de asegurar un sistema de nitrificación estable.

### *Composición del afluente al proceso*

Las aguas residuales están compuestas por multitud de diversas sustancias orgánicas e inorgánicas, que siguen diferentes rutas de transformación en la EDAR. La composición exacta de las aguas residuales determina la composición potencial de las especies dentro de cada grupo funcional, ya que muchas bacterias requieren compuestos orgánicos específicos para poder crecer. En el estudio de Wang *et al.* (2010), se observó que las BOA mostraron mayor diversidad en las EDAR que trataban ARU que en aquellas que tenían procedencia industrial, lo cual indica que la composición del afluente tiene una gran influencia en la estructura de estas poblaciones.

Entre los diferentes componentes de las aguas residuales la concentración de amonio es uno de los parámetros clave en la dinámica poblacional de las BOA. Del mismo modo, la concentración de nitrito determina en gran medida la composición de la comunidad de las BON a nivel de género. A pesar de ello, numerosos estudios apuntan que, a pesar de ser un parámetro altamente influyente, no es determinante en la composición de estas comunidades. Por ejemplo, se ha observado que *Nitrospira* fue el género dominante en ambientes con nutrientes limitados como el suelo superficial (Ke *et al.*, 2013), mientras que *Nitrobacter* fue más competitiva en suelos con elevadas concentraciones de materia orgánica (Wertz *et al.*, 2012). Otro ejemplo es el de *Ca.*

*Nitrospira defluvii*, la cual puede competir con el género *Nitrobacter* con niveles transitorios elevados de nitritos, sin embargo concentraciones elevadas permanentes favorecen el crecimiento de *Nitrobacter* (Nogueira *et al.*, 2006). Tal y como se ha visto en el apartado anterior la distribución de los diferentes linajes de *Nitrosomas* también está influenciada por la concentración de amonio en el medio (Bollmann y Laanbroek, 2001; Otawa *et al.*, 2006).

Diferentes autores han demostrado que elevadas concentraciones de materia orgánica tienen un impacto negativo sobre los procesos de nitrificación, principalmente debido a la competencia existente entre bacterias nitrificantes y bacterias heterótrofas por el oxígeno. En términos generales, se considera que la carga orgánica afecta negativamente al rendimiento de procesos de nitrificación favoreciendo la obtención de bajos rendimientos de eliminación de nitrógeno (Xia *et al.*, 2008). La relación DBO<sub>5</sub>/NTK, la cual representa la relación entre las concentraciones de materia orgánica biodegradable expresada como DBO<sub>5</sub> y la de Nitrógeno Total Kjeldahl, se ha relacionado con la fracción de microorganismos nitrificantes presentes en el tratamiento biológico. Teóricamente esta fracción aumenta para menores valores de esta relación.

Las bacterias nitrificantes son inhibidas por una serie de compuestos químicos, tanto orgánicos como inorgánicos. Algunos de los principales son la alitiourea (ATU), el cianuro potásico, el acetileno, la hidracina, el monóxido de carbono, el etanol o los tensoactivos. Por lo que la presencia de los mismos en el afluente del proceso va a determinar los rendimientos de eliminación del amonio en el sistema.

### *El pH*

El pH se considera una de las variables que tiene mayor influencia sobre la tasa de crecimiento de las bacterias nitrificantes. Durante la nitrificación existe una tendencia a acidificar el medio debido al consumo de alcalinidad asociado a la oxidación aerobia del amonio y nitrito. Existe una amplia variación en los efectos observados del pH sobre la nitrificación. En el estudio de González *et al.* (2010) se observó que las tasas de nitrificación máxima se mantuvieron para valores de 7,2 a 9,0 aproximadamente, mientras que para valores inferiores a 6,5 se redujeron de forma brusca. A pesar de ello, parece haber un consenso en que el pH óptimo tanto para las BOA como para las BON es neutro o ligeramente alcalino, en un intervalo entre 7 y 8.

## Temperatura

La temperatura es un parámetro clave en el metabolismo microbiano y de manera particular en las poblaciones nitrificantes debido a su baja tasa de crecimiento (Gerardi, 2002). Es por ello que, de manera general, una baja temperatura induce varios problemas en procesos biológicos de tratamiento de aguas residuales, especialmente en la eliminación biológica de nitrógeno (Kim *et al.*, 2006).

La influencia directa de la temperatura en los procesos metabólicos ha impulsado los estudios sobre el comportamiento de las bacterias nitrificantes frente a cambios en este parámetro. Existe cierto consenso en que las temperaturas óptimas para el proceso de nitrificación se sitúan en el rango entre 28 y 32°C en las EDAR. Así mismo la velocidad del proceso de nitrificación aumenta proporcionalmente con la temperatura en rangos mesófilos. En numerosas investigaciones, donde se han estudiado diferentes temperaturas, se ha observado que el problema se produce cuando la temperatura disminuye por debajo de 16 °C. A partir de esta temperatura la velocidad del proceso de nitrificación se reduce aproximadamente a la mitad (Gerardi, 2002) y consecuentemente conlleva asociada una pérdida de la estabilidad en el sistema. En estas situaciones es necesario trabajar con elevados tiempos de retención celular para que el proceso pueda llevarse a cabo (González *et al.*, 2010).

Park *et al.* (2009) demostraron que la disminución de la temperatura fue el factor más influyente en la comunidad de BOA presente en un reactor biológico de tratamiento de aguas residuales salinas. Así mismo, demostraron que la reducción afectó a la actividad nitrificante y produjo cambios en la composición de las especies de la comunidad de BOA. Estas observaciones coincidieron con las de Siripong y Rittman (2007), en su estudio se examinó la diversidad de comunidades nitrificantes en las siete plantas de tratamiento con temperaturas comprendidas entre 8,9 y 26,7°C. Este estudio determinó que la temperatura fue uno de los factores determinantes de la abundancia de BOA y del equilibrio entre los géneros *Nitrosospira* y *Nitrosomonas*. Sin embargo, en el estudio de Cydzik-Kwiatkowska *et al.* (2012), en una planta a escala real, las variaciones de temperatura entre 11,9 y 21,6°C no afectaron a la composición de la comunidad nitrificante.

Wan *et al.* (2011) propusieron que el tipo de sistema de tratamiento influye en la sensibilidad de BOA a la temperatura. En su estudio se observó que las BOA fueron más sensibles a la temperatura en un sistema convencional de fangos activos que las poblaciones de BOA presentes en un MBR. Por el contrario Limpiyakorn *et al.* (2005) evaluaron la respuesta de la comunidad de BOA respecto a las variables estacionales en 12 EDAR. Sus resultados mostraron que la temperatura no produjo efectos detectables en las comunidades de BOA.

### Salinidad

Se ha observado que la salinidad elevada no afecta el rendimiento biológico pero sí puede reducir la diversidad microbiana en los sistemas de depuración. En el estudio de Wang *et al.* (2017) a pesar de la elevada relación C/N, BOA del género *Nitrosomonas* y las AOA *Candidatus Nitrososphaera* contribuyeron a la oxidación de amonio, sin ser afectadas aparentemente por la salinidad. Por el contrario el aumento de la salinidad afectó a la comunidad de BON, que se vio inhibida significativamente. En este estudio la población de BOA se vio más afectada por la salinidad que la población de AOA.

### Concentración de oxígeno disuelto

La nitrificación es un proceso aerobio y, por tanto, la presencia de OD es fundamental para su desarrollo. Por cada mg de nitrógeno en forma amoniacal que se nitrifica se consumen aproximadamente 4,2 mg de oxígeno. De manera generalizada se ha establecido que para asegurar la actividad nitrificante se debe garantizar una concentración mínima de oxígeno, en torno a 2 mg/L en el reactor biológico. A pesar de ello y aunque el OD es un factor limitante del crecimiento de BOA en reactores, se ha indicado que el linaje *N. europaea* puede enriquecerse tanto en sistemas con alto contenido de OD como en los de bajo OD (Park y Noguera, 2004). Estas conclusiones están respaldadas por algunos estudios donde se ha observado que *Nitrosomonas* spp. es predominante en entornos con diferentes concentraciones de OD, como los reactores de oxidación de amonio anaeróbios a escala de laboratorio (Quan *et al.*, 2008), sistemas con configuración *Ludzack-Ettinger* modificado a escala real (Figuerola *et al.*, 2010) y reactores nitrificantes SBR a escala piloto (Gieseke *et al.*, 2003).

La concentración de OD también parece ser otro factor ambiental importante en la distribución de las BON. Se ha observado que los diferentes gradientes de oxígeno en biopelículas y suelos proporcionan nichos diferentes para las BON. Así mismo las intensidades de aireación variables afectaron a las abundancias relativas de los linajes I y II de *Nitrospira* en reactores de tratamiento de ARU (Park *et al.*, 2008).

### *Tiempo de retención celular*

El TRC se puede definir como el tiempo medio que una célula permanece en el proceso. La tasa de crecimiento de los microorganismos nitrificantes es inferior a la de los heterótrofos aerobios, por lo que la nitrificación requiere de TRC superiores a los tiempos necesarios para la eliminación de la materia orgánica carbonosa.

En los sistemas microbianos la competencia entre dos especies no está definida únicamente por su afinidad por el sustrato, sino que la tasa de crecimiento de una especie también tiene un papel primordial en este proceso. El lento crecimiento de la biomasa nitrificante es una limitación para la proliferación de estos microorganismos en los sistemas de fangos activos, por lo que el TRC es un parámetro importante en este proceso. Müller *et al.* (2003), indicaron que el TRC mínimo para que se produzca nitrificación está entorno a los 7 días, aunque los cambios de temperatura afectan a este parámetro. Winkler *et al.* (2017) analizaron la dinámica de la población microbiana mediante qPCR (PCR cuantitativa), y observaron que no solo la concentración de sustrato determinó la competencia entre *Nitrospira* y *Nitrobacter*, sino que el TRC fue un parámetro fundamental en la determinación de la estructura poblacional. Otro ejemplo fue el estudio de Limpiyakorn *et al.* (2005) donde se observó que el TRC contribuyó a determinar la abundancia de BOA, mientras que la concentración de oxígeno disuelto (OD) afectó principalmente su actividad.

## **1.8 APLICACIÓN DE OZONO PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES**

Los problemas de bulking y foaming son una causa frecuente de pérdida de calidad en el efluente de las EDAR con sistemas de fangos activos. Estos episodios, causados por



la proliferación de bacterias filamentosas en los tanques de aireación, afectan a las propiedades de sedimentación del fango (Jenkins *et al.*, 2004) produciendo la aparición de sólidos suspendidos en el efluente del decantador secundario. El excesivo crecimiento de bacterias filamentosas puede ser controlado con métodos no específicos como la adición continua de bajas dosis de ozono (Caravelli *et al.*, 2006; Van Leeuwen y Pretorius, 1988).

El ozono es una tecnología particularmente interesante para el tratamiento de aguas residuales. Cuando se aplica a los procesos de fangos activos su fuerte potencial de oxidación contribuye a la solubilización de los sólidos suspendidos y las sustancias poliméricas extracelulares (EPS, extracellular polymeric substances), la lisis celular y la oxidación y mineralización de materia orgánica. El ozono, además, reacciona con los sólidos inertes, oxidándolos y transformándolos en compuestos más biodegradables. La mayoría de sus aplicaciones se han centrado en la reducción de la producción de fangos causadas por el ciclo de solubilización-crecimiento críptico producido por la ozonización de la corriente de recirculación de fangos (Sakai *et al.*, 1997; Yasui *et al.*, 1994). El ozono también ha sido usado para mejorar la degradación de compuestos refractarios (Gommers *et al.*, 2007) y como pretratamiento en la digestión de fangos, con el objetivo de aumentar la producción de biogas (Weemaes *et al.*, 2000). Estudios más recientes centran la aplicación de esta tecnología en la eliminación de contaminantes traza (Umar *et al.*, 2013) y la recuperación de recursos en el fango (Qiang *et al.*, 2015).

La eficiencia del ozono en la reducción del bulking filamentoso y la mejora de las propiedades de sedimentación de los fangos activos ha sido demostrada en repetidas ocasiones (Caravelli *et al.*, 2006; Levén *et al.*, 2016). Esta aplicación se basa en la tendencia de las bacterias filamentosas a crecer fuera del flóculo y en la elevada relación superficie-volumen que presentan; la combinación de estos dos factores provoca que sean más susceptibles a los agentes oxidantes que otras bacterias presentes en la matriz del flóculo (Saayman *et al.*, 1996).

Tal y como se ha expuesto, la ozonización ha sido ampliamente usada como tratamiento adicional para la mejora de los sistemas de tratamiento de aguas residuales. A pesar de ello, desde el desarrollo de esta técnica han surgido numerosas cuestiones sobre el impacto de su aplicación en la calidad del efluente y en la estructura, actividad y viabilidad de la comunidad microbiana (Agustina *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2013).

Estos impactos pueden ser debidos al aumento de las cargas de DQO soluble, nitrógeno y fósforo en el reactor, y la modificación de los tipos de fuentes de carbono, consecuencia de la liberación de materia orgánica y restos celulares durante la ozonización. Estas variaciones tienen como consecuencia una alteración de las poblaciones microbianas habituales del proceso y en su metabolismo (Yapsakli *et al.*, 2010), lo que impacta directamente en el rendimiento del proceso de depuración.

Entre estos problemas, existe una mayor preocupación sobre el efecto que el tratamiento con ozono puede causar en el proceso de nitrificación. Diferentes autores han documentado efectos negativos del proceso de ozonización sobre la nitrificación (Gardoni *et al.*, 2011; Meng *et al.*, 2013; Sui *et al.*, 2014; Vergine *et al.*, 2007), pero solo unos pocos estudios proporcionan información sobre el impacto de la ozonización en la estructura de la comunidad nitrificante (Chen *et al.*, 2017; Izahadeh *et al.*, 2014; Levén *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2009b). En la mayoría de estos estudios los ratios de nitrificación alcanzados fueron suficientes para asegurar la calidad del efluente. Esto indica que, a pesar de los efectos negativos detectados, la ozonización y la eliminación biológica de nitrógeno son tecnologías compatibles. Böhler y Siegrist (2004) describieron que los ratios de nitrificación podían ser mantenidos en un sistema durante la ozonización controlando el TRC. Sin embargo, en las plantas a escala real se observan inhibiciones en la nitrificación o disminución de los ratios del proceso con frecuencia debido a que este proceso está influenciado por numerosos factores, además del TRC. Por tanto, es necesario determinar qué combinación de factores contribuye a la mejor estabilidad del proceso de nitrificación en fangos ozonados.

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios llevados a cabo en esta área se han centrado en la optimización de las condiciones del proceso de ozonización de fangos, ya que la generación de ozono es un proceso que demanda gran cantidad de energía. Estos estudios han proporcionado un mejor entendimiento de los efectos que el tratamiento de ozono tiene en las comunidades microbianas y de las reacciones que tiene lugar. A pesar de ello la mayoría han sido llevados a cabo en plantas piloto durante cortos periodos de tiempo, ya que la aplicación de ozono en plantas a escala real es un proceso operacionalmente complejo (Semblante *et al.*, 2017). Sin embargo, aplicaciones de ozono durante largos periodos probablemente tengan mayor influencia en las propiedades de los

fangos activos (Dytczak *et al.*, 2007). En estos estudios además, se ha demostrado que la aplicación de ozono afecta a las eficiencias de eliminación y al consumo de energía. Sin embargo, el rendimiento de una EDAR es el resultado de una compleja interacción entre los factores ambientales, condiciones del afluente y variables operacionales, por lo que resulta interesante estudiar las correlaciones entre los mismos.

## 1.9 MÉTODOS MOLECULARES PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE POBLACIONES MICROBIANAS

En las últimas décadas se han realizado numerosos esfuerzos para caracterizar y cuantificar las poblaciones microbianas implicadas en el tratamiento de efluentes y, de manera particular, las que participan directamente en la eliminación de nitrógeno. Para este cometido, se han utilizado de manera tradicional métodos basados en el cultivo, los cuales permiten una identificación selectiva de los microorganismos vivos. Estos métodos han proporcionado la base para nuestra comprensión del mundo actual microbiano y son necesarios para los estudios fisiológicos. A pesar de ello, en ocasiones no son adecuados para el análisis de muestras ambientales, ya que hasta la fecha no hemos descubierto cómo cultivar la mayoría de la gran diversidad de microorganismos presentes en la naturaleza.

Los métodos moleculares independientes de cultivo, han revolucionado el estudio de la diversidad microbiana. La amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y la secuenciación se han utilizado durante décadas para estudiar la presencia y la diversidad de los microorganismos involucrados en los procesos de depuración de aguas residuales (Gilbride *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2012). Sin embargo, los sesgos inherentes a estas técnicas, relacionados con la amplificación de la PCR y la especificidad de los iniciadores limitan la información cuantitativa que se puede extraer de estos análisis (Harms *et al.*, 2003). Otra de las técnicas moleculares que se ha aplicado en numerosos estudios de microbiología de aguas residuales es la hibridación *in situ* con sondas 16S DNA marcadas con fluoróforos (FISH). Esta técnica proporciona información cuantitativa sobre los grupos dominantes involucrados en los diferentes procesos de depuración (Daims *et al.*, 2001; Nielsen *et al.*, 2009). El desarrollo de las técnicas de metagenómica ha causado un punto de inflexión en el estudio de la diversidad filogenética y funcional de los ecosistemas naturales y artificiales, entre ellos los sistemas de tratamiento de aguas residuales. El

desarrollo de las llamadas técnicas de secuenciación de alto rendimiento (HTS, High Throughput Sequencing), como la pirosecuenciación 454 o Illumina entre otras, ha permitido producir millones de lecturas de secuencias a un bajo coste. La gran cantidad de datos que generan, permite explorar los ecosistemas microbianos en profundidad. Sin embargo, estos enfoques también tienen ciertas limitaciones, las cuales provocan que la mayor parte de la información derive únicamente de los miembros más abundantes de la comunidad. A continuación, se realizará un breve repaso de las técnicas moleculares que han sido utilizadas en el desarrollo de esta tesis.

### 1.9.1 Técnica molecular de hibridación *in situ* con sondas marcadas con fluoróforos (FISH)

Tal y como se comentaba anteriormente, los fangos activos contienen una compleja población microbiana que, en la mayoría de ocasiones, no es posible caracterizar mediante métodos dependientes de cultivo (Wagner *et al.*, 1993). Entre la gran variedad de técnicas no basadas en cultivo destaca la técnica molecular FISH. Esta técnica permite la detección e identificación de microorganismos *in situ* en comunidades complejas con alto grado de especificidad gracias al empleo de sondas específicas.

La técnica FISH está basada en la hibridación DNA/RNA de una región del gen 16S o 23S rRNA. Estos genes se emplean habitualmente debido a su estructura y estabilidad genética, ya que en la fracción 16S del RNA ribosómico coexisten regiones conservadas con regiones variables. El nivel de ribosomas en la célula bacteriana permite una buena amplificación de la señal que facilita la detección del híbrido DNA:RNA.

Para ello, esta técnica emplea secuencias de oligonucleótidos sintéticas (sondas), que se unen específicamente formando un híbrido con el rRNA de los organismos diana bajo condiciones específicas. Las secuencias de DNA están marcadas con sustancias fluorescentes llamadas fluoróforos, que permiten la detección de las células diana mediante el uso de un microscopio de epifluorescencia.

Las sondas FISH deben ofrecer una alta sensibilidad y especificidad. La sensibilidad se refiere al nivel de fluorescencia suficiente para distinguir la célula hibridada de la fluorescencia de fondo, que es función de la región del 16S rRNA donde hibride la sonda

diana. 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.

Las sondas FISH pueden ser diseñadas en función de la especificidad deseada, ajustándose a los diferentes niveles taxonómicos. Estas deben ser suficientemente específicas para unirse únicamente a la bacteria diana, que en ocasiones puede coexistir con moléculas de rRNA muy homólogas. Para evitar posibles falsos positivos y aumentar la especificidad de la técnica se utilizan sondas competidoras, las cuales no se marcan con fluoróforos. El tamaño de las sondas oscila entre 15 y 30 pares de bases (Fuchs *et al.*, 2001).

Las condiciones de hibridación, temperatura y porcentaje de formamida, son factores clave para que se mantengan los requisitos de sensibilidad y especificidad. En la mayoría de los protocolos, la temperatura de hibridación se mantiene constante y es la concentración de formamida lo que da lugar a unas condiciones más o menos astringentes. La concentración de formamida en el tampón de hibridación permite disminuir la temperatura de desnaturalización del DNA. Esto se consigue gracias al debilitamiento de los puentes de hidrógeno entre los dúplex DNA-DNA y DNA-RNA, entre 0,6-0,72 °C por porcentaje utilizado, (Moter y Göbel, 2000). De esta manera se mantiene la morfología celular y se consigue una hibridación específica (Rodríguez, 2011).

La técnica FISH aporta información, que otros medios no pueden ofrecer, acerca de la morfología, cantidad y distribución espacial en el medio. Esta técnica presenta ciertas ventajas sobre la técnica de PCR, ya que no requiere de cultivo previo ni de la extracción de ácidos nucleicos y evita los problemas de unión inespecífica o sustancias inhibidoras que dificulten la hibridación. Debido a su rapidez y especificidad, la técnica FISH, junto con las técnicas de cuantificación por tratamiento de imagen, es una buena herramienta para el control y seguimiento de las poblaciones de bacterias nitrificantes.

El protocolo habitual de la técnica FISH comprende 4 pasos principalmente (Figura 10): fijación y permeabilización de la muestra, hibridación, lavado y visualización mediante microscopía (Amann *et al.*, 2001).

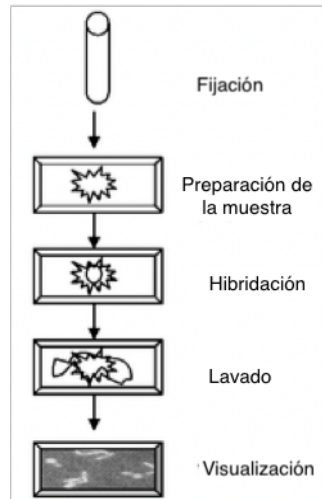


Figura 10. Protocolo FISH (Modificado de Amann *et al.*, 2001)

El primer paso es la fijación y permeabilización de las muestras, su objetivo es permitir la penetración de la sonda en el interior de la célula y proteger el RNA de la degradación por RNAsas endógenas (Moter y Göbel, 2000). Para la hibridación pueden utilizarse también sondas FISH modificadas con bases LNA (Locked Nucleic Acid), que permiten aumentar la especificidad y la sensibilidad de unión con las regiones de rRNA, debido a su mayor afinidad de hibridación con la región RNA específica. Las sondas LNA tienen una modificación en los anillos de ribosa, que consiste en la formación de un puente entre el oxígeno 2' y el carbono 4' de dicho anillo, lo cual permite un aumento de la estabilidad térmica y de la especificidad (Sarma *et al.*, 2010). Por cada nucleótido LNA en la sonda se posibilita un aumento entre 1-8°C en la temperatura de fusión del duplex de RNA-DNA, lo que le confiere mayor estabilidad en condiciones de hibridación más restrictivas y por tanto son más selectivas.

### 1.9.2 Metagenómica de secuenciación dirigida

La metagenómica es una disciplina englobada dentro de la genómica, cuyo objetivo principal es entender los ecosistemas microbianos a través del estudio del contenido genómico de sus microorganismos. Esta técnica, junto con la bioinformática, permite

inferir información funcional y taxonómica de una muestra recogida directamente de un ambiente concreto, sin necesidad de realizar cultivos previos (Handelsman *et al.*, 2002).

Las técnicas de secuenciación metagenómica han evolucionado de manera progresiva desde clásica secuenciación Sanger (técnica de secuenciación de primera generación) hasta las técnicas HTS o también llamadas técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS, *Next Generation Sequencing*). Estas técnicas han permitido secuenciar el DNA de organismos de entornos que anteriormente estaban fuera de nuestro alcance. Su principal ventaja, y que ha permitido su exponencial aplicación, es que permiten generar una gran cantidad de información a un bajo coste. La desventaja frente a otros métodos como el Sanger es la menor longitud de las secuencias obtenidas en las técnicas de secuenciación de segunda generación (Temperton y Giovannoni, 2012).

Los estudios metagenómicos pueden tener como objetivo la secuenciación de genomas completos (WGS, *Whole Genome Sequencing*) o la secuenciación dirigida a genes específicos del genoma (Figura 11). La secuenciación de genomas completos, la cual emplea un enfoque de tipo de secuenciación no dirigida o también conocido como *shotgun* permite caracterizar la totalidad de microorganismos presentes en una muestra. Este enfoque consiste en la fragmentación aleatoria y posterior secuenciación de pequeñas partes del DNA extraído de una muestra. A continuación, las secuencias obtenida son ensambladas bioinformáticamente, formando secuencias mayores hasta reconstituir los distintos genomas total o parcialmente (Tringe y Rubin, 2005). Esta técnica, además de la información taxonómica, permite obtener información metabólica y funcional de la comunidad estudiada (Hugenholtz y Tyson, 2008). Este tipo de estudios lleva asociada una alta complejidad computacional y un elevado tiempo de procesamiento, debido a la gran cantidad de datos obtenidos.

En la actualidad, la metagenómica de secuenciación dirigida es el método más utilizado para determinar la diversidad microbiana presente en muestras ambientales complejas. Para ello, tras la extracción del DNA de la muestra a analizar, se amplifica mediante PCR un gen marcador taxonómicamente informativo común a los organismos de interés. Para bacterias y arqueas se utiliza el gen que codifica la subunidad 16S del ARN ribosómico (16S rRNA) el cual se considera un marcador informativo a nivel taxonómico y filogenético (Hugenholtz y Pace, 1996). Este gen contiene regiones altamente conservadas

y regiones hipervariables (Figura 12). Las regiones conservadas aportan la estructura necesaria para el diseño de los iniciadores, mientras que las regiones hipervariables permiten diferenciar los distintos microorganismos y clasificarlos taxonómicamente. Durante la PCR se amplifican exponencialmente los fragmentos de DNA específico, los productos de este proceso se denominan amplicones. Para identificar y cuantificar los microorganismos presentes en la muestra analizada, los amplicones resultantes de la PCR son secuenciados y caracterizados bioinformáticamente.

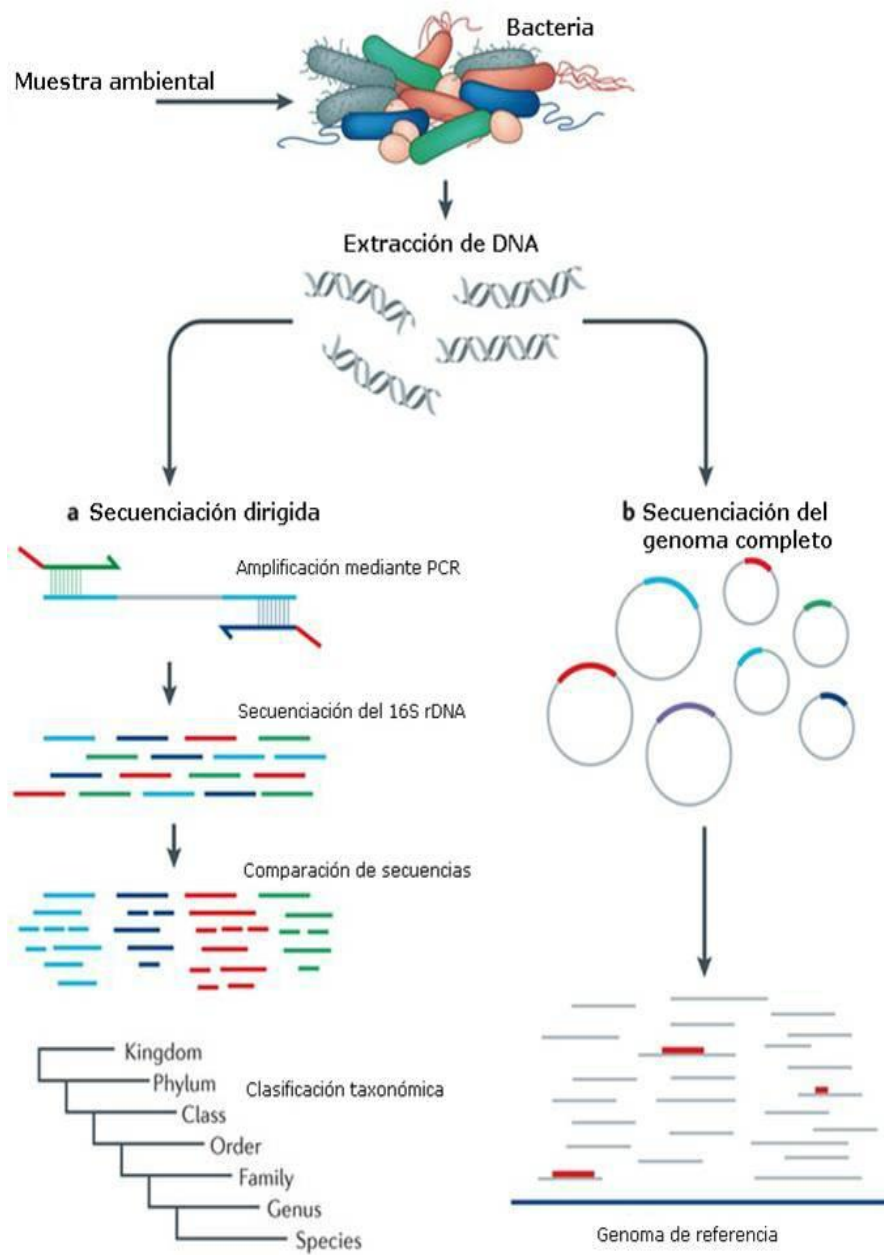


Figura 11. Diferentes aproximaciones metagenómicas. Adaptado de Lasken y McLean (2014).



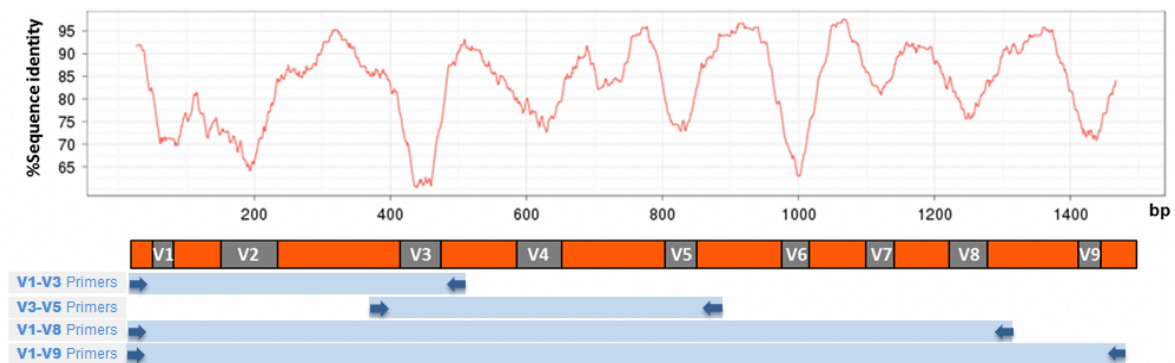


Figura 12. Representación gráfica del gen 16S rRNA. Traducido de Pacific Bioscience, (2009)

Se muestra la identidad de secuencia del gen 16S rRNA de más de 6,000 bacterias en comparación con la secuencia de consenso. Las inmersiones indican regiones hipervariables. Las regiones hipervariables (V1-V9) se muestran en gris y las regiones conservadas en naranja.

En la actualidad entre estas técnicas podemos establecer dos grandes grupos: las técnicas de secuenciación de segunda generación (SSG) y las técnicas de secuenciación de tercera generación (STG).

### Secuenciación de Segunda Generación

Una de las principales características que diferencia las técnicas de SSG de aplicaciones anteriores es que no requieren la construcción de una librería de clones de DNA. Esto es debido a que estas técnicas permiten secuenciar directamente los fragmentos de DNA.

Illumina® es una de las plataformas de secuenciación masiva, más usadas para el estudio de las comunidades microbianas. Esta plataforma emplea la tecnología de secuenciación de síntesis de terminación reversible (Figura 13). MiSeq® es uno de los secuenciadores más destacados de los que pueden emplearse para realizar este tipo de secuenciación.

En esta técnica de secuenciación mediante una PCR puente (Figura 14) los fragmentos de DNA de las librerías son sometidos a una amplificación clonal, seguida de una secuenciación utilizando un nucleótido terminador reversible protegido por un grupo 3'-OH y marcado con un fluoróforo (Berglund *et al.*, 2011).

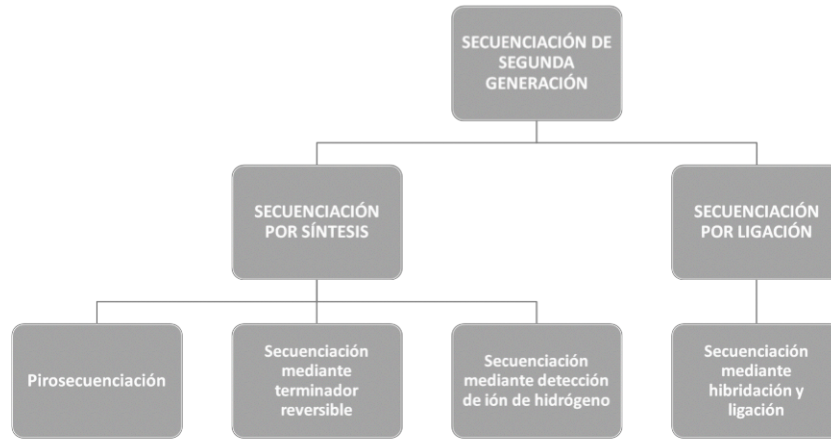


Figura 13. Esquema de las tecnologías de secuenciación de segunda generación. Adaptado de Ambardar et al. (2016)

Después de la adición de los nucleótidos terminadores reversibles, la DNA polimerasa incorpora estos nucleótidos modificados en la hebra de DNA que se está sintetizando. Cada ciclo consiste en: (1) incorporación de un nucleótido terminador reversible a la hebra de DNA inmovilizada en la cámara de flujo, (2) detección de la señal de fluorescencia generada, y (3) eliminación del grupo 3'-OH mediante descomposición de este grupo y de la molécula fluorescente. Este ciclo se repite hasta 300 veces en el secuenciador MiSeq® y da lugar a la secuenciación de la molécula de DNA molde de cada clúster (Figura 14). No se producen errores de secuenciación de homopolímeros, ya que cada vez se incorpora una única base y para la adición de la siguiente se elimina el nucleótido terminador.

La plataforma de secuenciación de Illumina® permite la secuenciación de amplicones de hasta 550 pares de bases (pb), ya que realiza lecturas de 300 pb por cada extremo (Van Dijk *et al.*, 2014; Ambardar *et al.*, 2016), además genera un elevado número de secuencias y ofrece una amplia cobertura.

Cuando los amplicones han sido secuenciados se obtienen las secuencias de los mismos, las cuales son denominadas “lecturas”. Para su análisis existen varios tipos de herramientas, las que requieren licencia comercial, las ubicadas en la nube y las de acceso abierto. Las herramientas de acceso abierto son las más utilizadas actualmente en investigación, entre ellas destaca QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology; <http://qiime.org/>). QIIME es una herramienta bioinformática de código abierto instalable

en los terminales de trabajo, capaz de realizar análisis metagenómicos sobre comunidades microbianas a partir de lecturas crudas generadas en la plataforma Illumina, entre otras (Caporaso *et al.*, 2010).

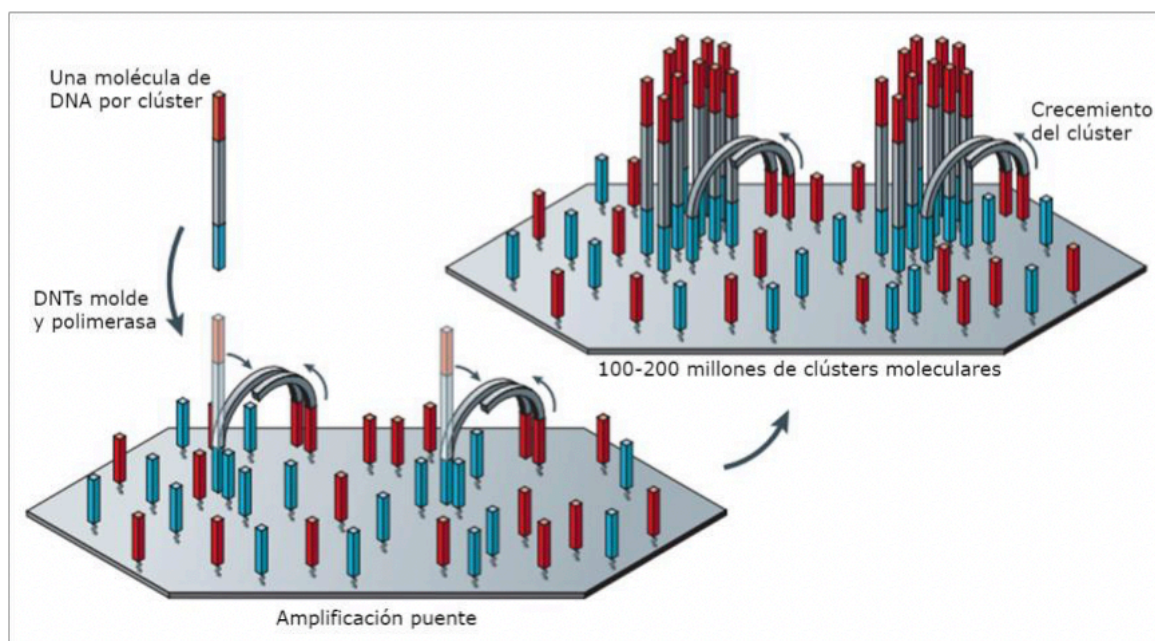


Figura 14. Amplificación puente del DNA molde inmovilizado en plataforma Illumina. Traducido de Metzker (2010)

El análisis bioinformático realizado con QIIME tiene el objetivo de obtener información de las lecturas crudas obtenidas en la secuenciación. usando QIIME se divide en dos fases. La primera comienza con la elaboración de un archivo, el *mapping file*, que contiene información acerca de las muestras con las que se va a trabajar (Figura 16). Después se identifican y eliminan secuencias quiméricas, que son artefactos de la secuencia. Un paso importante de esta primera fase es la formación de OTUs (Operational Taxonomic Unit), que son agrupaciones de secuencias que se forman entre secuencias altamente similares. A cada OTU se le asigna una taxonomía microbiana, para lo cual se debe proporcionar una base de datos taxonómica. Finalmente se construye la tabla de OTUs, que es una matriz que contiene el número de secuencias de cada OTU y su predicción taxonómica. Con estos datos se puede obtener los porcentajes de abundancia relativa de cada OTU (Navas-Molina *et al.*, 2015).

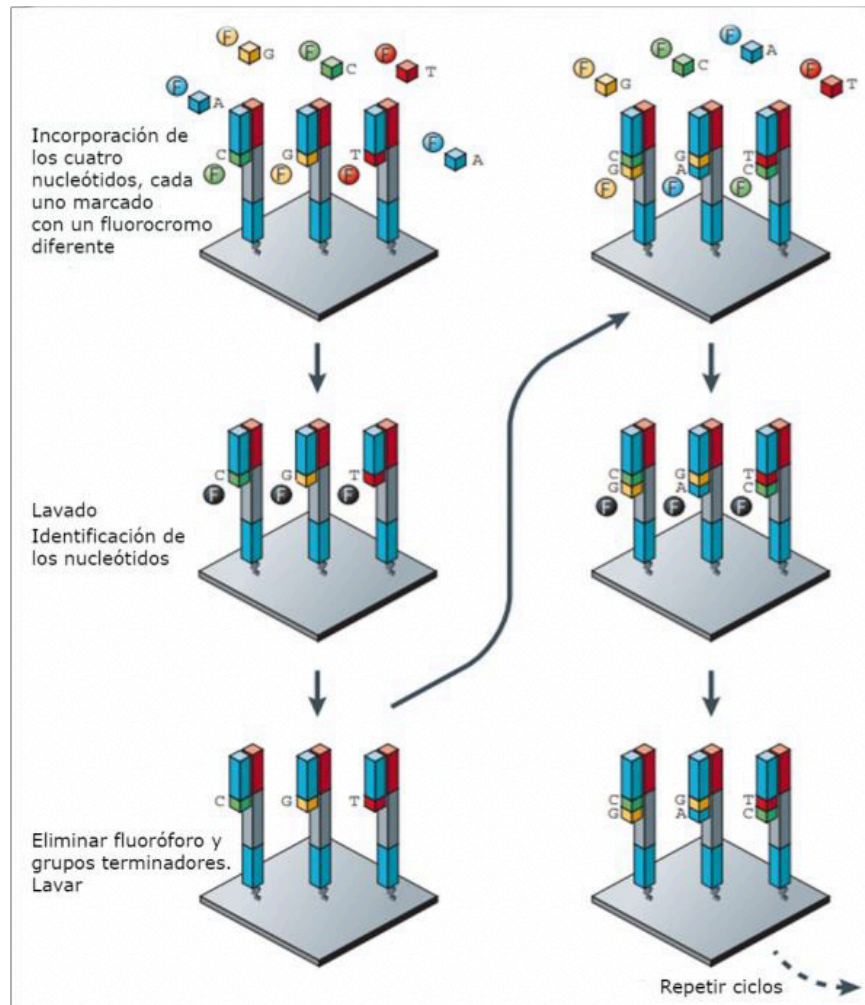


Figura 15. Método de secuenciación mediante nucleótidos terminadores reversibles de Illumina. Traducido de Metzker (2010)

La segunda fase comienza una vez se ha generado la tabla de OTUs. Se puede resumir la abundancia relativa de cada OTU a diferentes niveles taxonómicos (filó, clase, orden, familia, género y especie) para, por ejemplo, identificar rápidamente qué muestras son distintas, o los patrones de abundancia de ciertos organismos en función de las características de las muestras (Navas-Molina *et al.*, 2015).

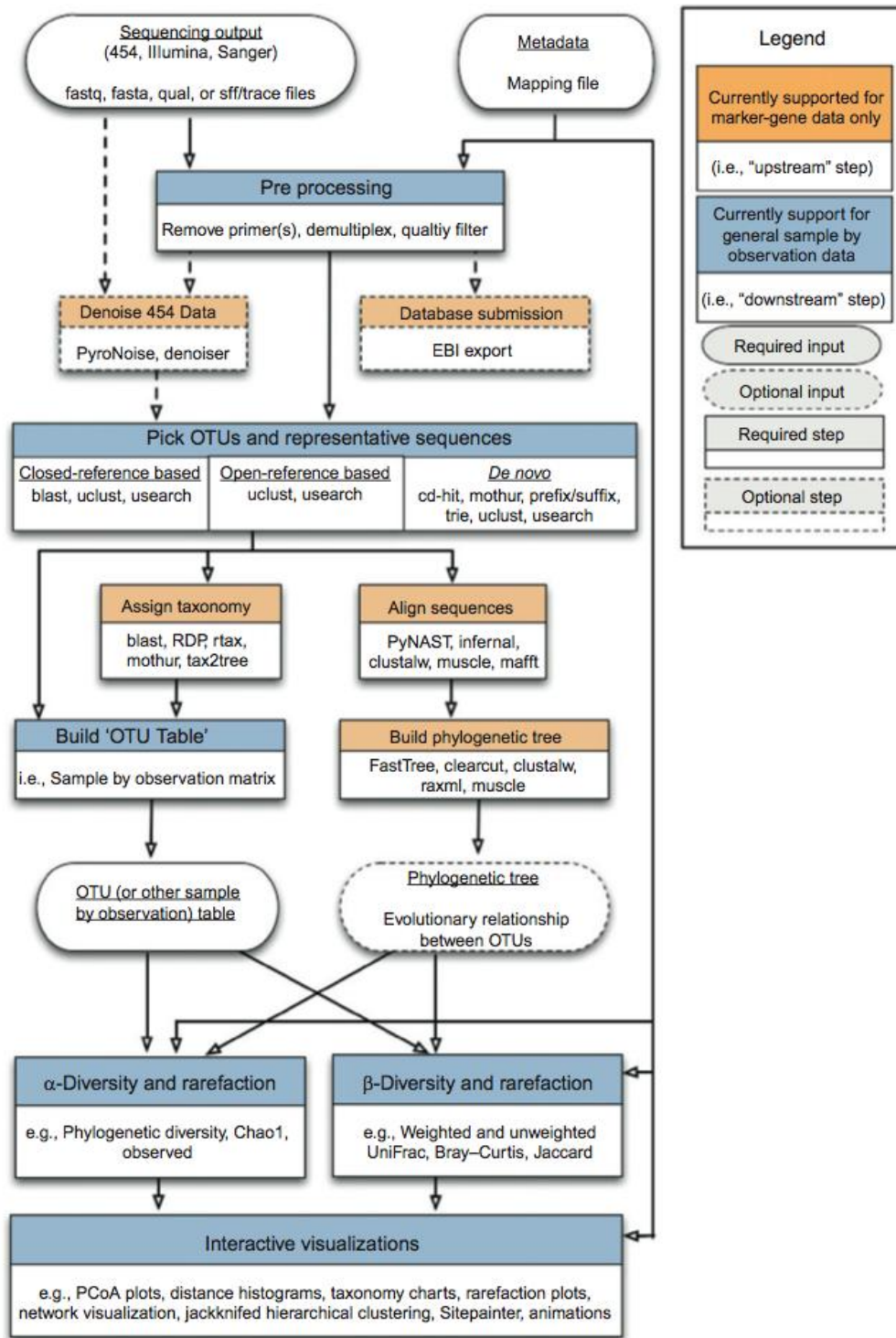


Figura 16. Esquema de trabajo en QIIME (Navas-Molina et al., 2015)

Pese a que la metagenómica de secuenciación dirigida es una herramienta potente tiene ciertas limitaciones. En primer lugar, puede no determinar una gran fracción de la

diversidad en una comunidad, debido a sesgos asociados a la PCR (Hong *et al.*, 2009; Sharpton *et al.*, 2011; Logares *et al.*, 2014). En segundo lugar, la secuenciación de los amplicones puede producir valores de diversidad muy diferentes en función de los iniciadores empleados (Yang *et al.*, 2016). Además, los errores de secuenciación y los amplicones incorrectamente ensamblados (las quimeras) pueden producir secuencias artificiales difíciles de identificar (Wylie *et al.*, 2012). En tercer lugar, esta herramienta determina la composición taxonómica de una comunidad microbiana, pero no puede determinar sus funciones biológicas asociadas. (Sharpton, 2014). Finalmente, es una herramienta limitada al análisis de los microorganismos de los que se conocen genes taxonómicamente informativos y pueden ser amplificados.

### *Secuenciación de tercera generación.*

Investigaciones anteriores han destacado que la precisión y sensibilidad de las lecturas aumenta con el tamaño de las lecturas (Yarza *et al.*, 2014). La novedosa técnica de secuenciación PacBio SMRT (single-molecule real-time) es capaz de obtener lecturas de secuencias de gran tamaño con una gran profundidad de cobertura, lo cual permite mejorar los perfiles filogenéticos y taxonómicos. Esto hace que sea una tecnología efectiva para la investigación de comunidades microbianas en sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales, que contienen una estructura microbiana compleja y una gran cantidad de microorganismos propios de condiciones extremas.

Las plataformas de secuenciación de tercera generación se caracterizan fundamentalmente por dos aspectos:

- No requieren la etapa de amplificación previa a la secuenciación. Esto disminuye el tiempo de preparación de la muestra de ADN y elimina los posibles errores asociados a la amplificación por PCR.

- La señal, bien sea fluorescente (PacBio), química (Ion Torrent) o eléctrica (tecnologías Nanopore) es detectada en tiempo real (Zhang *et al.*, 2011a). De todas ellas, sólo se comentará la plataforma PacBio, ya que fue la empleada en el presente trabajo.

La técnica de secuenciación PacBio SMRT se basa en la secuenciación en tiempo real de una sola molécula. Esto es principalmente lo que define los secuenciadores de

tercera generación, mientras que en los secuenciadores de segunda generación se necesita algún tipo de amplificación, la secuenciación de tercera generación parte de la secuenciación de una única molécula.

Al igual que las técnicas de SSG, este tipo de secuenciación también se utiliza el gen que codifica la subunidad del 16S rRNA. A pesar de ello, mientras que en la tecnología de Illumina se analizan las regiones de V3 a V5, proporcionando lectura de hasta 550 pb en la secuenciación PacBio SMRT se analiza la región de V1 a V9 (Figura 12). Actualmente las secuencias obtenidas son de alta calidad y pueden abarcar una longitud de hasta 1500 pb, lo cual permite mejorar la capacidad de asignación y simplificar el ensamblaje del genoma.

Al igual que Illumina los secuenciadores PacBio funcionan con la secuenciación de síntesis, aunque la tecnología es diferente. En la secuenciación SMRT una DNA-polimerasa se fija en una superficie y un laser excita los nucleótidos fluorescentes a medida que se incorporan en tiempo real. La secuenciación SMRT aprovecha el proceso natural de replicación del DNA al mismo tiempo que permite la observación de la síntesis de DNA en tiempo real. Para ello se basa en dos innovaciones clave: la tecnología *Zero Mode Waveguide* (ZMW) y los nucleótidos fosfolincados. La tecnología ZMW, cuenta con orificios circulares de 70 nm de diámetro y 100 nm de profundidad que están nanofabricados sobre una superficie de vidrio (Figura 17). Estos orificios permiten que la luz ilumine únicamente el fondo de un pocillo en el que se inmoviliza un complejo de DNA polimerasa/plantilla. Los nucleótidos fosforilados permiten la observación del complejo inmovilizado, ya que la DNA polimerasa produce una cadena de DNA completamente natural.

Esta tecnología utiliza el secuenciador Sequel®, en el cual se lleva a cabo el método de secuenciación circular. En este método el DNA es fragmentado al azar y un nucleótido (adenina) es añadido en el extremo 3'. Este nucleótido se añade para facilitar la ligación posterior del adaptador. El adaptador es un oligonucleótido de DNA de cadena sencilla, el cual junto con el DNA molde, que también es una cadena lineal, formará una estructura de horquilla intramolecular. La célula SMRT donde se lleva a cabo la secuenciación, alberga una disposición configurada de ZMW, la cual permite detectar la incorporación de un único nucleótido gracias a su pequeño tamaño.



Figura 17. Célula SMRT conteniendo 150000 ZMW (zero-mode waveguide) (Pacific Bioscience, 2009)

Durante la secuenciación (Figura 18) la polimerasa se difunde en un ZMW y el adaptador se une a esta inmovilizada en la parte inferior.

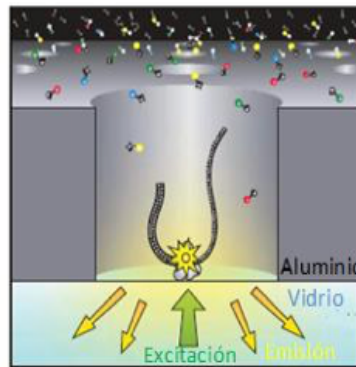


Figura 18. Difusión de la polimerasa en el ZMW. Adaptado de Eid *et al.* (2009).

Cada uno de los nucleótidos está marcado con un fluoróforo diferente, de manera que tengan distintos espectros de emisión (Figura 19). Cuando un nucleótido es incorporado se produce un pulso de luz que identifica la base correspondiente. Durante el proceso de secuenciación se sigue la siguiente secuencia: (1) un nucleótido fluorescente se asocia con la plantilla en el sitio activo de la polimerasa, próximo a la superficie de vidrio del ZMW, (2) la salida de fluorescencia del color correspondiente a la base incorporada, (3) por debajo del vidrio, una cámara de alta resolución registra la salida de fluorescencia del color correspondiente al nucleótido que se incorpora, (4) la polimerasa se traslada a la siguiente posición, (5) el siguiente nucleótido se asocia con la plantilla en el sitio activo de la polimerasa, iniciando los siguientes eventos de incorporación de nucleótidos (Eid *et al.*, 2009). El pequeño volumen generado en cada uno de los orificios permite detectar



únicamente la incorporación de un solo nucleótido. La luz emitida por un láser ilumina solamente la parte inferior del pocillo, de forma que cuando la DNA polimerasa incorpora un determinado nucleótido este será excitado emitiendo una determinada señal fluorescente que será recogida por un detector, permitiendo su identificación.

En la Figura 20 se presenta la naturaleza circular de la plantilla de DNA SMRTbell, que permite a la polimerasa secuenciar la misma molécula de DNA varias veces con múltiples pases. Esto produce una alta precisión de consenso intramolecular. Esta secuenciación es llevada a cabo en el secuenciador Sequel®, el cual permite secuenciar directamente el DNA y lograr lecturas de secuencias largas con una cobertura uniforme.

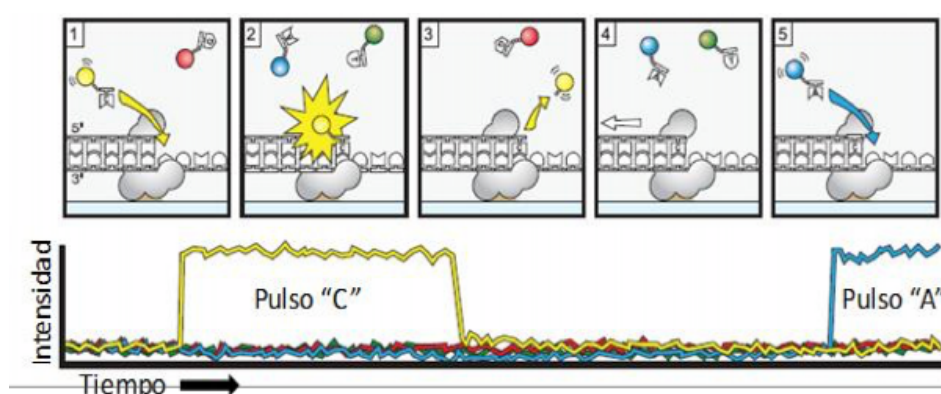


Figura 19. Proceso de secuenciación SMRT. Adaptado de Eid et al. (2009)

La secuenciación de PacBio también se beneficia de un perfil de error no iniciado. Esto significa que la secuenciación repetida de una región borra en lugar de exacerbar los errores individuales, ya que es muy poco probable que los errores de lectura aleatorios sigan apareciendo en el mismo lugar una y otra vez.

La principal ventaja de la secuenciación SMRT es la capacidad de obtener lecturas largas que abarcan fragmentos genómicos medidos en decenas de miles de bases, mientras que las plataformas de Illumina producen multitud de datos de DNA de secuencias de lecturas cortas. Cuando se abarcan estudios con un enfoque WGS los fragmentos producidos por Illumina se ensamblan computacionalmente. Sin embargo, la secuenciación en tiempo real de una sola molécula de PacBio captura datos de secuencias de alta calidad de cadenas de DNA que abarcan entre 15 y 30000 bases, lo que simplifica enormemente el

ensamblaje del genoma, especialmente en regiones altamente repetitivas o estructuralmente desafiantes, donde los datos de lectura corta pueden resultar ambiguos. Cuando el enfoque es de secuenciación dirigida las lecturas más largas, obtenidas mediante la tecnología SMRT, permiten profundizar en la identificación taxonómica de las especies detectadas.

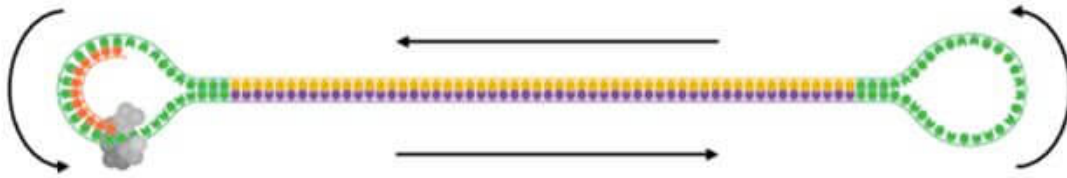


Figura 20. Horquilla de secuenciación (SMRTbell). Adaptado de Pacific Bioscience (2017).  
Los adaptadores de horquilla (verde) ligados al final de la doble molécula de DNA (amarillo y púrpura), formando un círculo cerrado. La polimerasa (gris) se ancla en el fondo de un ZMW y incorpora las bases en la hebra de lectura (naranja).

Aunque ambas técnicas permiten determinar una gran proporción de los microorganismos presentes en una muestra (Sharpton, 2014), su cobertura no es suficiente para detectar las especies con una menor concentración en la población (Kalyuzhnaya *et al.*, 2008). En ambas técnicas se obtiene gran cantidad de información, el análisis bioinformático puede llegar a ser muy complejo.

## 1.10 TÉCNICAS RESPIROMÉTRICAS PARA LA MEDIDA DE LA ACTIVIDAD

La respirometría es una técnica ampliamente extendida para la monitorización de los procesos de fangos activos. Esta técnica está basada en la medición indirecta del consumo de oxígeno de una población microbiana bajo unas condiciones experimentales definidas (Spanjers *et al.*, 1996). Los dispositivos más comunes para realizar esta determinación se denominan respirómetros. Estos equipos están compuestos por un pequeño reactor biológico con un sensor de oxígeno, el cual permite medir el diferencial de la concentración de oxígeno respecto al tiempo.

La tasa de consumo de oxígeno (OUR) es una medida directa de la actividad de la biomasa. En los procesos microbianos esta tasa representa la respiración endógena y/o exógena de los microorganismos. La respiración endógena comprende el consumo de

oxígeno de los microorganismos asociado a la producción de energía para su mantenimiento en ausencia de una fuente externa de sustrato. La determinación de esta tasa aporta información sobre la actividad y el estado de una determinada población microbiana. La respiración exógena, por su parte, corresponde al oxígeno consumido en la asimilación de un sustrato para el crecimiento celular. El análisis del consumo de oxígeno en respuesta a la metabolización de un sustrato, aporta información muy precisa, tanto de la actividad de los microorganismos, como de la biodegradabilidad del sustrato y de la velocidad a la que es consumido. Es por ello que esta técnica ha sido ampliamente utilizada para la caracterización de aguas residuales y evaluación de la actividad biológica de los fangos activos. Los análisis respirométricos han sido confirmados en repetidas ocasiones como herramientas útiles para la determinación de los parámetros estequiométricos y cinéticos de la biomasa (Munz *et al.*, 2008; Trapani *et al.*, 2018), que se utilizan en modelos matemáticos para el diseño y la gestión de las plantas de tratamiento.

Las técnicas respirométricas han sido utilizadas para modelar la oxidación del amonio en diferentes tipos de sistemas (Zeng *et al.*, 2015) y bajo diferentes condiciones (Yang *et al.*, 2004). Es bien sabido que, debido a las diferencias cinéticas en la oxidación del amonio entre las BOA, no existe un conjunto estándar de valores cinéticos que puedan usarse como representativo para el diseño de las EDAR. Trapani *et al.* (2018) usaron técnicas respirométricas para caracterizar las constantes cinéticas y determinar las condiciones de operación de un sistema combinado MBR-IFAS para el tratamiento de AR. Los resultados de su estudio mostraron una influencia significativa de la configuración de las plantas evaluadas en la actividad respiratoria de la biomasa y que la salinidad afectaba principalmente a la actividad de las bacterias autótrofas. En el estudio de Kayee *et al.* (2016b) en el que se utilizaron cultivos de BOA disponibles como referencia, los valores de la constante de semisaturación determinados en los fangos analizados estuvieron influenciados principalmente por las especies de BOA dominantes. Estos hallazgos implican que se pueden requerir diferentes conjuntos de valores cinéticos de las especies dominantes en la nitrificación para un diseño y operaciones de la EDAR más precisos. Los parámetros cinéticos de las AOA también han sido estudiados (Martens-Habbena *et al.*, 2009) y han permitido determinar los nichos de separación entre AOA y BOA.

### 1.11 TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN DEL ATP

El Adenosín-5- Trifosfato (ATP) es la principal molécula de intercambio de energía de los seres vivos, excepto en los virus. Tiene un papel importante tanto en los procesos catabólicos, como en los anabólicos. El ATP se sintetiza durante la fosforilación oxidativa utilizando la energía liberada en el catabolismo. Esta energía es liberada posteriormente y utilizada en los procesos anabólicos y el crecimiento celular. Por tanto, el rendimiento de producción de biomasa es directamente proporcional a la cantidad de ATP producida.

Todas las células vivas, incluidas las no cultivables, contienen ATP. Por lo tanto, la medida de ATP puede proporcionar una buena estimación de la biomasa activa total en muestras de agua. La prueba del ATP ha demostrado ser aplicable para la medición de biomasa activa en varios ambientes. En la década de los años 70 ya se reconoció el interés del ATP para monitorizar los procesos en los sistemas de tratamiento de aguas residuales (Patterson *et al.*, 1970, Weddle y Jenkins, 1971). Posteriormente, Archibald *et al.*, (2001), concluyeron que las medidas de ATP resultaban útiles para medir la proporción de células viables y como indicador de toxicidad en un proceso de fangos activos. Posteriores estudios demostraron que el ATP era un parámetro interesante para prevenir cambios no deseados en el proceso de depuración (Arretxe *et al.*, 1997; Dalzell y Christofi, 2002) o determinar el impacto de los productos farmacéuticos en el estado de la biomasa de un MBR (Maeng *et al.*, 2013). Sin embargo, debido a la complejidad de la determinación de la medida de ATP, en la práctica no se utiliza como parámetro para estimar la biomasa de microorganismos en las EDAR.

El ATP puede medirse mediante bioluminiscencia a partir de la enzima luciferín-luciferasa, propia de la especie *Photinus pyralis* (Gould y Subramani, 1988; Kyriakides *et al.*, 1991). Esta medida se basa en la siguiente reacción:



En presencia de esta enzima, el ATP reacciona con el oxígeno y la luciferina produciendo una emisión de fotones de luz amarillo-verdosa. Cada molécula de ATP consumida en la reacción produce un fotón de luz que puede ser cuantificada utilizando un luminómetro. La intensidad de la luz emitida se mide en Unidades Relativas de Luz (URL), cuyo valor es directamente proporcional a la cantidad de ATP presente en la muestra.

El ATP que proviene de las células rotas, y por tanto muertas, se encuentra disuelto (ATPd) en las muestras de aguas y fangos. Se ha comprobado que el ATPd se mantiene durante un tiempo prolongado en el medio. Se requieren procesos de extracción previos a la cuantificación del ATP que contienen las células vivas, ATP celular (ATPc).

A partir de la aparición de la llamada ATPmetría de segunda generación (ATP2G®), se han desarrollado sistemas de medida del ATP en matrices complejas como aguas residuales y en los sistemas de tratamiento de las mismas (Luminultra™). Mediante un fotómetro y los reactivos correspondientes se pueden obtener medidas de ATP total (ATPt), ATPd y ATPc.

Así mediante un extractante se libera el ATP celular, se mide el ATPt y por diferencia se puede obtener el valor de ATP en el interior de las células, que corresponde a la biomasa de células viables. A partir de estos datos se puede obtener el índice de estrés de la biomasa (BSI, por su siglas en inglés), que se expresa en porcentaje y representa el porcentaje de biomasa viva, y por tanto, da una idea del estado de la biomasa celular.

La medida del ATP celular se puede considerar una medida de la potencial energía disponible para la biomasa viva en una muestra. Debido a que la energía representa la capacidad de la biomasa para trabajar, el ATP celular representa la concentración de biomasa viva como se muestra a continuación en la Figura 21.

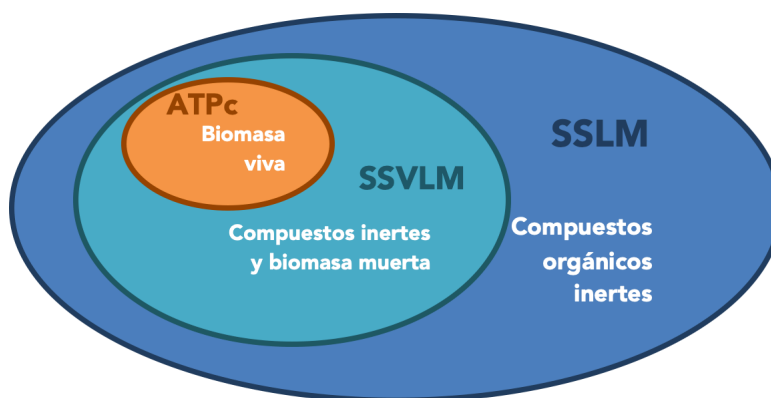


Figura 21. Medida de la fracción de sólidos activos mediante ATP

La fracción de biomasa viva contenida en los SSVLM está en el rango del 15-40%, aunque este valor es muy variable (Levin *et al.*, 1975).

Existen factores de conversión desarrollados por algunos autores (Tchobanoglous *et al.*, 2003) en los se considera que la biomasa contiene aproximadamente el 50% de carbón en peso seco, por lo que se puede deducir factores de conversión para determinar el valor de sólidos suspendidos volátiles activos del licor mezcla (SSVALM).

## 1.12 PRINCIPALES TÉCNICAS DE ORDENACIÓN MULTIVARIANTE EMPLEADAS EN ESTUDIOS DE ECOLOGÍA

Los microorganismos son los principales actores en los tratamientos de aguas residuales ya que catalizan la conversión de compuestos los orgánicos e inorgánicos. En estos sistemas los microorganismos están influenciados por numerosos factores ambientales, algunos de ellos propios de ambientes extremos, que con frecuencia sufren cambios rápidos y muy marcados. Es por ello que es fundamental comprender la dinámica poblacional de las comunidades microbianas y su relación con las variables ambientales.

Han sido numerosos los esfuerzos empleados en desvelar los factores que influyen en la composición y la actividad de las bacterias nitrificantes, los cuales tienen como objetivo avanzar en el conocimiento de los ecosistemas, contribuyendo a desarrollar estrategias que permitan un mejor control y mejora de los procesos.

Zornoza (2017) destaca 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.

- 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.
- Potenciar una simbiosis Universidad-Empresa que garantice el intercambio de experiencias y conocimientos entre ambas partes.
- 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 serie de rutinas multivariantes como herramientas útiles para poder rechazar o confirmar hipótesis planteadas por el investigador. Nadie conoce los datos mejor que

el propio investigador, siendo por tanto el responsable último de la decisión de las técnicas estadísticas a emplear.

En el siguiente apartado se resumen algunas de las principales consideraciones y rutinas empleadas para el pretratamiento y la exploración de datos y, posteriores estudios de interpretación ambiental aplicables a la evaluación de la dinámica poblacional de las bacterias nitrificantes.

### 1.12.1 Exploración de datos

Previamente a la aplicación de rutinas de interpretación ambiental es importante realizar una exploración de las variables que van a intervenir en el estudio, con el objetivo de conocer las matrices que posteriormente serán utilizadas. En este tipo de estudios se emplean habitualmente dos tipos de matrices. La matriz de variables ambientales, también denominadas explicativas o independientes y matriz de variables biológicas o matriz respuesta o dependiente, que representa los diferentes grupos de microorganismos a estudiar.

Unas de las herramientas más extendidas para la exploración de los datos son los estadísticos descriptivos: media, mediana, desviación estándar y rango (mínimo-máximo). El diagrama de cajas y bigotes (*box plots*), es también una representación muy útil que ayuda a visualizar la dispersión y simetría de los datos. En ella se representan los tres cuartiles, la mediana, el rango intercuartílico, el máximo y el mínimo de los datos y los valores anómalos.

### 1.12.2 Pretratamiento de datos.

El pretratamiento de los datos es una etapa crucial del análisis estadístico. De su adecuación dependen directamente la calidad de los modelos de interpretación ambiental obtenidos (Ramette *et al.*, 2007). El pretratamiento a realizar está en función del enfoque multivariante elegido. A continuación se resumen los tratamientos más habituales para trabajar con matrices distancia.

La transformación de los datos biológicos tiene como objetivo moderar la influencia de aquellos microorganismos que presentan abundancias elevadas respecto a

aquellos que presentan abundancias bajas. Las transformaciones más comúnmente utilizadas en ecología microbiana son: ninguna transformación, raíz cuadrada, raíz cuarta, Log (X+1) y transformación binaria. En la cuales existe una gradación del peso que se otorga a las variables más abundantes frente a las que no lo son. 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.

El pretratamiento de los datos ambientales tiene varios objetivos. En primer lugar estabilizar la varianza y aproximar la distribución de los datos a la normalidad, ya que frecuentemente las variables ambientales no presentan una distribución normal o simétrica. Para valorar la distribución de los datos se emplean, en general, histogramas de frecuencias o gráficos de dispersión de puntos (*draftsman plot*). Se pueden emplear también test numéricos, como los tests de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. Para la normalización de variables habitualmente se emplean transformaciones logarítmicas o de raíz cuadrada.

Otro de los objetivos del pretratamiento de las variables ambientales es la estandarización de los datos. La estandarización se utiliza para eliminar la influencia de las diferentes unidades de medida de las variables ambientales, las cuales no permiten la comparación en los análisis basados matrices distancia. Este proceso puede realizarse a través de las rutinas de estandarización existentes en el programa Primer v7 (Clarke et al., 2014).

### 1.12.3 Análisis exploratorio multivariante

El análisis exploratorio multivariante tiene como objetivo representar la similitud entre objetos a partir de los valores asociados a ellos, de manera que los objetos similares se representan unos cerca de otros. Es por ello que resulta una herramienta muy útil para visualizar patrones de distribución de grandes conjuntos de datos.

La exploración multivariante de la matriz de variables ambientales y de la matriz de variables biológicas se realiza mediante técnicas de ordenación y clasificación. Algunas de estas técnicas se resumen a continuación.



### *Análisis clúster.*

El objetivo del análisis clúster es reducir la dimensionalidad del conjunto de datos. Para ello utiliza técnicas de análisis multivariantes para agrupar los objetos en categorías, basados en sus similitudes o disimilitudes. De esta manera la técnica permite minimizar la variación dentro de un grupo y maximizar la variación entre los grupos, revelando de este modo, categorías definidas de objetos (James y McCulloch, 1990; Legendre y Legendre, 1998).

El primer paso del análisis clúster es la elección de un coeficiente de similitud o disimilitud para medir la asociación entre objetos o entre variables. A continuación es necesario calcular la matriz distancia asociada, que se representará en forma de árbol horizontal o como grupos distintos de objetos. 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 (bacterias nitrificantes) 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 estrés 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 esta técnica se utilizó 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 el mayor porcentaje 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 la relativa inflexibilidad de la definición del PCA, limita su utilidad de forma práctica en 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 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 estrés 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 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 análisis multivariante de la varianza permutacional (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.**

El análisis de similitudes (ANOSIM), 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 factores definidos.

#### 1.12.4 Interpretación ambiental.

A continuación, se describen las 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 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).

##### *Análisis indirecto del gradiente*

El modo en que influyen las variables ambientales en la composición biótica de los ecosistemas ha sido a menudo explorado 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 altamente 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 poco correlacionadas con los primeros ejes de ordenación obtenidos en el primer paso del estudio, se pueden llegar a omitir las relaciones importantes.

### *Análisis directo del gradiente*

Mediante las técnicas de análisis directo del gradiente se consigue relacionar de modo directo la variación en la composición de las comunidades de microorganismos con la variación ambiental (Gauch, 1982). En comparación con estos métodos, los primeros métodos más simples de análisis indirecto representaban cada valor de abundancia de los organismos frente a valores de una variable ambiental. Sin embargo, la realidad en ecología es distinta, ya que son numerosas las variables ambientales que condicionan la dinámica de las diferentes especies, además resulta interesante evaluar su efecto de forma conjunta. Con este objetivo 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 solución a los problemas de falta de normalidad y de linealidad en la relación entre variables biológicas y

ambientales, a pesar de ello cada organismo seguirá requiriendo un análisis individual y de colinealidad. Además, cuando el número de variables ambientales de influencia 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/muestras y especies/variables ambientales sean representadas tan fácilmente como sea posible a través de ángulos entre flechas y distancias entre puntos y flechas.

### *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 y Anderson (1999) y más tarde perfeccionado por McArdle y Anderson (2001). Legendre y 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 y 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 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. Previa 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.



## 2. Objetivos

---



El presente trabajo se ha desarrollado con el objetivo de estudiar las relaciones entre la dinámica poblacional de las bacterias nitrificantes y su actividad con las variables fisicoquímicas, operacionales y los rendimientos de eliminación de nitrógeno del proceso en 6 reactores con sistema de fangos activos. El estudio de estas relaciones permitirá mejorar la comprensión del sistema biológico de nitrificación, y disponer de una metodología aplicable para su monitorización.

Para el desarrollo del mencionado objetivo general, se ha planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Identificación y cuantificación de diversas subclases de BOA y BON mediante la técnica molecular de hibridación *in situ* con sondas marcadas con fluoróforos (FISH).
2. Exploración multivariante de la estructura poblacional de las bacterias nitrificantes respecto al factor espacial y estacional en las EDAR analizadas.
3. Construcción de modelos de ordenación ambiental simples para la búsqueda de relaciones entre la dinámica poblacional de las bacterias nitrificantes y las variables ambientales y operacionales del proceso.
4. Estudiar la dependencia espacial y temporal de los rendimientos de eliminación del nitrógeno y los componentes del nitrógeno en las EDAR analizadas.
5. Estudiar la influencia de las variables operacionales y ambientales en los rendimientos de eliminación de las diferentes fracciones del nitrógeno, a partir de la búsqueda de modelos de interpretación ambiental.
6. Explorar las relaciones entre la comunidad de bacterias nitrificantes y los componentes del nitrógeno.
7. Valorar el impacto de la aplicación de bajas dosis de ozono en la comunidad de bacterias nitrificantes y en los rendimientos de eliminación del nitrógeno.
8. Caracterizar la actividad de la biomasa nitrificante mediante la determinación de sus tasas de respiración endógena y exógena y explorar su relación con la comunidad de bacterias nitrificantes.
9. Analizar la variabilidad en las tasas de respiración de las bacterias nitrificantes y su relación con las variables operacionales y ambientales mediante modelos de ordenación ambiental.

10. Cuantificar los sólidos suspendidos volátiles activos del licor mezcla, a partir de la medida del ATP intracelular, y evaluar su relación con los sólidos suspendidos volátiles calculados con el procedimiento convencional.
11. Reformular el cálculo de la carga másica a para aportar un dato más preciso sobre la relación sustrato-microorganismos activos en el licor mezcla.
12. Valorar la capacidad del índice de estrés del sistema, los sólidos suspendidos volátiles activos del licor mezcla y la carga másica calculada a partir de ellos, como variables explicativas del proceso de nitrificación.
13. Caracterizar las comunidades bacterianas presentes del licor de mezcla mediante técnicas de secuenciación masiva de segunda generación.
14. Caracterizar las comunidades bacterianas presentes del licor de mezcla mediante técnicas de secuenciación masiva de tercera generación.
15. Comparar los resultados obtenidos mediante las diferentes técnicas moleculares utilizadas para la caracterización de comunidades bacterianas y comunidades nitrificantes.

### 3. Materiales y métodos

---



### 3.1 ORIGEN DE LAS MUESTRAS DE FANGO ACTIVO

Para el estudio de la dinámica poblacional de bacterias nitrificantes en sistemas de fangos activos se analizaron un total de 188 muestras de licor mezcla, agua residual afluyente y efluente del proceso de depuración. Las muestras procedieron de cinco EDAR situadas en España: EDAR Cuenca del Carraixet (CX), EDAR Quart-Benàger (QB), EDAR Denia-Ondara-Pedreguer (DN), EDAR Castellón (CT) y EDAR Molina del Segura (ML). Estas EDAR se consideraron de interés para el estudio por presentar diferentes tipos de procesos biológicos y rendimientos del proceso de nitrificación. A continuación se realiza una breve descripción de cada una de ellas. En el Anexo 1 se puede encontrar más información de cada una de ellas.

#### *EDAR Quart-Benàger (QB)*

La EDAR Quart-Benàger (QB) está ubicada en la provincia de Valencia (Comarca de l'Horta Oest). Esta EDAR trata un caudal medio anual aproximado de 35023 m<sup>3</sup>/día y sirve a una población de 166942 habitantes equivalentes. La EDAR QB utiliza un proceso biológico Ludzack-Ettinger de mezcla completa con eliminación de nitrógeno mediante aireación intermitente. El sistema está compuesto por cuatro reactores en paralelo.



Figura 22. Vista aérea de la EDAR Quart-Benàger

### *EDAR de Castellón (CT).*

La EDAR de Castellón de la Plana se localiza en la provincia de Castellón (comarca de la Plana Alta). Esta planta cuenta con dos líneas de proceso independientes (CT1 y CT2), las cuales tratan conjuntamente 34157 m<sup>3</sup>/d y sirven a una población de 193773 habitantes equivalentes. Cada línea opera con dos reactores en paralelo con un esquema Ludzack-Ettinger modificado de flujo en pistón. Cada uno de los reactores cuenta con un equipo de ozonización flotante, instalado con el objetivo de controlar el foaming filamentoso causado principalmente por *Gordonia amarae*. El sistema de ozonización de fangos consiste en un generador de ozono (Turboxal, Air Liquide S.A., France), el cual usa oxígeno puro como alimentación. Este generador distribuye el ozono a través de un eyector situado en la base del reactor, produciendo una emulsión gas/líquido en el licor mezcla. Durante el periodo estudiado el sistema fue operado con diferentes concentraciones de ozono variando sus dosis de 0 a 3,59 mgO<sub>3</sub>/gSSLM.



Figura 23. Vista aérea de la EDAR Castellón

### *EDAR Cuenca del Carraixet (CX)*

La EDAR Cuenca del Carraixet (CX) está ubicada en la provincia de Valencia (comarca de L'Horta Nord). Utiliza un proceso Ludzack-Ettinger de flujo en pistón sin recirculación interna. La EDAR tiene dos líneas de tratamiento en paralelo; cada una de las líneas cuenta con dos reactores en paralelo. El efluente de los reactores es mezclado previamente 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 es de 15784



m<sup>3</sup>/día para la línea 1, y de 23677 m<sup>3</sup>/día para la línea 2. Esta EDAR sirve a una población de 178080 habitantes equivalentes.



Figura 24. Vista aérea de la EDAR Carraixet

#### *EDAR Dénia-Ondara-Pedreguer (DN)*

La EDAR Dénia-Ondara-Pedreguer está ubicada en la provincia de Alicante, (comarca de la Marina Alta). Esta depuradora da servicio a una población de 45152 habitantes equivalentes, y trata un caudal medio anual de aproximado de 19089 m<sup>3</sup>/día. Cuenta con un sistema de tratamiento compuesto por tres reactores dispuestos en serie en régimen de oxidación total. La eliminación de nitrógeno en esta EDAR se produce mediante alternancia de zonas anóxicas y óxicas. Los reactores cuentan con un sistema de lógica difusa para el control del sistema de aireación.



Figura 25. Vista aérea de la EDAR Denia-Ondara-Pedreguer

### *EDAR Molina del Segura (ML)*

La EDAR Molina del Segura está ubicada en la región de Murcia, (comarca de la Vega Media del Segura). Esta depuradora da servicio a una población de 271250 habitantes equivalentes, y trata un caudal medio anual de aproximado de 25515 m<sup>3</sup>/día. La EDAR cuenta con un proceso biológico de fangos activos en flujo de pistón con esquema Ludzack-Ettinger, compuesto por dos reactores en paralelo. Posee un tratamiento terciario de coagulación-floculación y posterior tratamiento de fangos. Además, cuenta con un sistema para el control de olores causados por sulfuro de hidrógeno, el cual se basa en la adición de cloruro férrico. En la Figura 26 se muestra una vista aérea de la EDAR, el esquema detallado de la planta puede consultarse en el Anexo 1.



Figura 26. Vistas aérea de la EDAR Molina del Segura

## 3.2 TOMA DE MUESTRAS

Las muestras de las EDAR QB, DN, CT y CX fueron tomadas durante un año con una frecuencia quincenal, desde diciembre de 2008 hasta diciembre de 2009. Las muestras de las EDAR ML fueron tomadas durante 21 meses con una frecuencia semanal, desde septiembre de 2017 hasta julio de 2018. Las muestras para la determinación de los parámetros fisicoquímicos fueron obtenidas a partir de la mezcla de muestras simples horarias en relación al caudal afluente de cada una de las EDAR.

Para el examen biológico en la EDAR DN se tomó una muestra simple a la salida del último reactor dispuesto en serie. En las EDAR CX, QB y ML, las muestras para el examen biológico fueron integradas a partir de la mezcla a partes iguales de muestras simples tomadas al final de cada uno de los reactores dispuestos en paralelo. En cada una de las líneas independientes de la EDAR CT (CT1 y CT2) se obtuvieron muestras integradas a partir de la mezcla a partes iguales de las muestras simples, tomadas en los reactores en paralelo que componen cada una de las líneas.

### 3.3 DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES FISICOQUÍMICAS

En la Tabla 2 se detallan las variables medidas en el licor mezcla en cada una de las EDAR del estudio; en la Tabla 3 se detallan las variables medidas en el afluente al reactor y el efluente del decantador secundario. Los análisis fisicoquímicos se realizaron según los protocolos del *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005) para SSLM, DQO, DBO<sub>5</sub> y las fracciones del nitrógeno y del fósforo. La DBO<sub>5</sub> fue determinada mediante el sistema Oxitop® (Reuschenbach *et al.*, 2003). Para la determinación de los componentes solubles, las muestras fueron inmediatamente filtradas después de su extracción usando un filtro de fibra de vidrio de 0,45  $\mu$  m. El índice volumétrico del fango a los treinta minutos (IVF30) y su forma diluida fueron determinados de acuerdo con Jenkins *et al.*, (2004).

Tabla 2. Variables fisicoquímicas medidas en el licor mezcla.

Parámetros	Abreviatura	Ud.	EDAR				
			CX	QB	DN	CT	ML
pH			x	x	x	x	x
Conductividad	CondLM	$\mu$ S/cm	x	x	x	x	x
Temperatura en el reactor biológico	T <sup>r</sup>	°C	x	x	x	x	x
Sólidos en suspensión del licor mezcla	SSLM	mg/L	x	x	x	x	x
Sólidos en suspensión volátiles del licor mezcla	SSVLM	mg/L	x	x	x	x	x
Índice volumétrico del fango a los 30 minutos	IVF30	ml/gSSLM	x	x	x	x	x
Nitrógeno total del licor mezcla	NTLM	mg/gSSLM	x	x	x	x	
Fósforo total del licor mezcla	PTLM	mg/gSSLM	x	x	x	x	
Demanda química de oxígeno del licor mezcla	DQOLM	mg/gSSLM	x	x	x	x	

Tabla 3. Variables fisicoquímicas medidas en el afluente al reactor y el efluente del decantador secundario.

Parámetros	Abreviatura	Ud.	Afluente al reactor						Efluente decantador secundario													
			CX		QB		DN		CT		ML		CX		QB		DN		CT		ML	
pH			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Conductividad		µS/cm	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Sólidos en suspensión totales	SST	mg/L	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Demanda química de oxígeno	DQO	mg/L	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Demanda química de oxígeno soluble	DQOs	mg/L	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Demanda biológica de oxígeno a los 5 días	DBO5	mg/L	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Nitrógeno total	NT	mg/L	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Nitrógeno total soluble	NTs	mg/L	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Nitrógeno Kjeldhal total	NKT	mg/L	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Nitrógeno Kjeldhal total soluble	NKTs	mg/L	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Nitrógeno amoniacal	N--NH4	mg/L																				
Nitrógeno nítrico	N-NO3	mg/L																				
Nitrógeno nitroso	N--NO2	mg/L	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Fósforo total	PT	mg/L	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Fósforo total soluble	PTs	mg/L	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Fósforo del ortofosfato	P-PO4	mg/L	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

### 3.4 DETERMINACIÓN DE VARIABLES OPERACIONALES

Las variables operacionales de control del proceso biológico utilizadas han sido las siguientes: carga másica (CM), tiempo de retención celular (TRC), tiempo de retención hidráulico en el reactor (TRH), tiempo de retención hidráulico en el decantador secundario (TRHds) y oxígeno disuelto en el reactor (OD) (Tabla 4). Todas las variables operacionales, a excepción del 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 las 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 y ML 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) (Zornoza *et al.*, 2017) y expresados en porcentaje de tiempo a partir de cada uno de los tres días anteriores a la toma de muestras del licor mezcla. En la EDAR CT fueron registrados los valores de la carga de ozono ( $O_3$ ), medida en Kg  $O_3$ /día, en ambas líneas (CT1 y CT2).

Tabla 4. Variables operacionales registradas.

Parámetros	Abreviatura	Ud.	Licor Mezcla				
			CX	QB	DN	CT	ML
Tiempo de retención hidráulico en el reactor	TRH	h	x	x	x	x	x
Tiempo de retención hidráulico en el decantador secundario	TRHds	h	x	x	x	x	x
Carga másica en base a la DBO5	CM	kg DBO5/kg SSVLM.d	x	x	x	x	x
Carga másica en base a la DQO	CM(DQO)	kg DQOs/kg SSVLM.d	x	x	x	x	x
Tiempo de retención celular	TRC	d	x	x	x	x	x
Oxígeno disuelto en el reactor < 0,8 mg/L	OD b	mg/L	x	x	x	x	x
Oxígeno disuelto en el reactor entre 0,8 y 2 mg/L	OD m	mg/L	x	x	x	x	x
Oxígeno disuelto en el reactor > 2 mg/L	OD a	mg/L	x	x	x	x	x
Carga de Ozono	$O_3$	Kg $O_3$ /d				x	

### 3.5 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE POBLACIONES DE BACTERIAS NITRIFICANTES MEDIANTE LA TÉCNICA MOLECULAR FISH

#### 3.5.1 Procesado de las muestras de fango activo para el análisis FISH

Las muestras de fango activo procedentes de la EDAR ML fueron disgregadas mecánicamente previamente a su fijación. Este tratamiento se realizó con la finalidad de mejorar los resultados en la identificación y cuantificación de las poblaciones nitrificantes, debido a que las muestras de esta EDAR presentaban una alta fluorescencia de fondo. La disgregación se llevó a cabo mediante los equipos Ultra-Turrax T25 (Wallner *et al.*, 1995) y Ultra-Turrax T8 (Ziglio *et al.*, 2002), ambos de IKA Labortechnik, Staufen, Germany. Estos equipos son capaces de desagregar la matriz biológica sin afectar a la integridad de la membrana ni la actividad celular (Ziglio *et al.*, 2002). En primer lugar, las muestras fueron disgregadas con el equipo Turrax 25 durante 5 minutos. A continuación se disgregaron con el equipo Turrax 8 durante 10 minutos, manteniéndose refrigeradas durante este periodo. Las muestras de las EDAR QB, DN, CT y CX no se tuvieron que disgregar.

#### 3.5.2 Fijación de las muestras

Para la fijación se centrifugó 1 ml de muestra durante 3 minutos a 7000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 1 ml de tampón fosfato salino (PBS). A continuación se realizó una segunda centrifugación a 7000 rpm y se eliminó el sobrenadante. El sedimento de la muestra lavada se resuspendió en 250 µl PBS y 750 µl de paraformaldehído (PFA). A continuación se mantuvo la muestra a 4°C durante 3 horas. Transcurrido este tiempo la muestra fue centrifugada a 7.000 rpm durante 3 minutos y lavada con PBS nuevamente para eliminar el PFA. Una vez eliminado el sobrenadante resultante de la última centrifugación, el sedimento se resuspendió en PBS y etanol a partes iguales y se almacenó a -20°C hasta la hibridación.

### 3.5.3 Hibridación de las muestras

La técnica molecular FISH (hibridación in situ con sondas 16S/23S DNA marcadas con fluoróforos) fue usada para identificar y cuantificar la comunidad de bacterias nitrificantes presentes en las 188 muestras de fangos activos. Para ello se depositaron 4 µl de muestra fijada en los pocillos de los portaobjetos y se dejaron secar al aire o en estufa a 37°C para acelerar el proceso. A continuación se realizaron deshidrataciones seriadas sumergiendo el portaobjetos en soluciones de etanol al 50%, 80% y absoluto, respectivamente durante 3 minutos. Los portaobjetos se dejaron secar al aire y a continuación se aplicó, en cada uno de los pocillos, 10 µl de la solución de hibridación con sonda, preparada en función de la sonda a utilizar (Anexo 2).

El portaobjetos se colocó horizontalmente en un tubo Falcon donde se introdujo papel de celulosa humedecido con 1,5 mL de solución tampón de hibridación. A partir de este momento la muestra se incubó a 46°C y en oscuridad durante 1,5 horas para las hibridaciones de las BOA y BON, y durante 3 horas para las sondas de las AOA.

Transcurrido el tiempo de hibridación los portaobjetos fueron lavados con una solución de lavado previamente preparada (Anexo 2). En primer lugar, se vertió una pequeña cantidad de la solución de lavado sobre el portaobjetos con la finalidad de eliminar la solución de hibridación de los pocillos. A continuación se sumergió el portaobjetos en 50 mL de la solución de lavado atemperada a 48°C durante 15 minutos. La finalidad de este paso fue eliminar los restos de sonda que no se hubieran unido al rRNA. Ambos pasos se realizaron en oscuridad. Transcurrido el tiempo de lavado los portaobjetos fueron lavados con agua destilada y secados al aire protegidos de la luz. Una vez secos los portaobjetos fueron almacenados a -20°C a la espera de su visualización.

#### *Sondas utilizadas en el estudio*

Se emplearon 11 sondas para hacer posible la identificación y cuantificación de los diferentes géneros y especies de bacterias nitrificantes más comunes en los sistemas de fangos activos. Para la identificación de las BOA se utilizaron 5 sondas: Nso1225, Nse1472, Nmo218, NEU y NmV. En la Figura 27 se resume la clasificación taxonómica de los organismos a los que identifican.

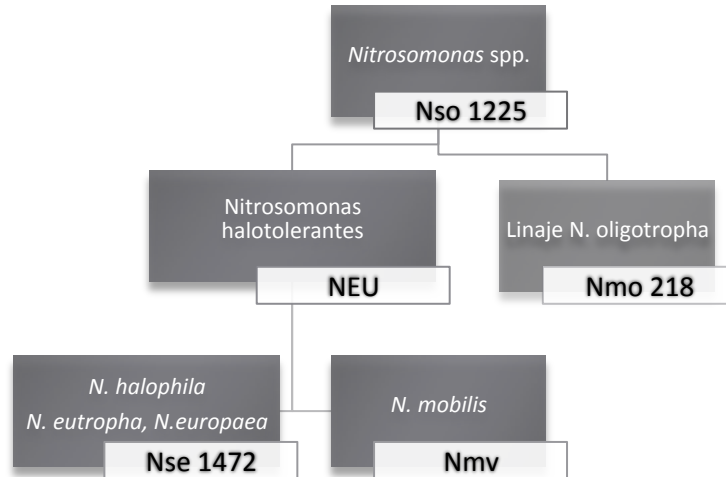


Figura 27. Sondas utilizadas para la identificación de BOA

Para la identificación de las BON se utilizaron 4 sondas de género *Nspta662*, *NIT3*, *Ntoga122* y *Ntcl804*; mientras que para la identificación de dos tipos diferentes de arqueas se utilizaron las sondas *Thau1162* y *Cren679*. En la Tabla 5 se describen cada una de las sondas empleadas en el presente estudio.

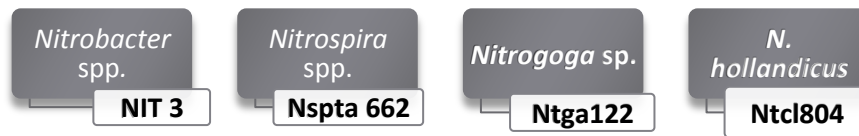


Figura 28. Sondas utilizadas para la identificación de BON



Tabla 5. Sondas utilizadas para la identificación de bacterias nitrificantes

Bacteria	Sonda	Especificidad (5'-3')	Especificidad	FA <sup>1</sup>	Referencia
Eubacteria	EUB 338 I	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Eubacteria	0-50	Amann (1990)
	EUB 338 II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	Planctomycetes	0-50	Daims et al., (1999)
	EUB 338 III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	Verruimicrobiales	0-50	Daims et al., (1999)
	EUB 338 IV	GCAGCCTCCCGTAGGAGT	Filo Eubacteria <sup>2</sup>	0-50	Daims et al., (1999)
BOA	Nso1225	CGCCATTGTATTACGTGTGA <sup>3</sup>	β Proteobacteria Amonioxidantes	45	Mobarry et al., 1996)
	Nse1472	ACCCAGTCATGACCCCC	Nitrosomonas halophila, N. eutropha y N. europaea.	50	Juretschko et al., (1998)
	Nmo218	CGGCCGCTCCAAAAGCAT	Nitrosomonas sp. Nm103	35	Gieseke et al., (2001)
	NEU	CCCCCTCTGCTGCACTCTA	La mayoría de Nitrosomonas spp. halófilas y halotolerantes..	40	Wagner et al., (1995)
	cNEU	TTCCATCCCCCTCTGCGG	Competidora <sup>4</sup>		Wagner et al., (1995)
	Nmv	TCCTCAGAGACTACGGGG	Nitrosococcus mobilis	35	Pommerening-Roser et al., (1996)
	Ntspa662	GGAATCCGGCTCCTCT	Nitrospira spp.	35	Daims et al., (2001a)
	CNtspa662	GGAATCCGGCTCCTCT	Competidora <sup>4</sup>		Daims et al., (2001a)
	NIT3	CCTGTGCTCCATGCTCCG	Nitrobacter spp.	40	Wagner et al., (1996)
	cNIT3	CCTGTGCTCCAGGCTCCG	Competidora <sup>4</sup>		Wagner et al., (1996)
Nitoga122	TCCGGGTACGTTCCGATAT	Nitrotoga sp.	40	Lücker et al., (2014)	
c1Nitoga122	TCWGGGTACGTTCCGATAT	Competidora <sup>4</sup>		Lücker et al., (2014)	
c2Nitoga122	TCYGGGTACGTTCCGATAT	Competidora <sup>4</sup>		Lücker et al., (2014)	
Ntlc804	CAG CGT TTA CTG CTC GGA	Nitrospira hollandicus	20	Sorokin et al., (2012)	
c1Ntlc804	CAG CGT TTA CTG CTC GGA	Competidora <sup>4</sup>		Sorokin et al., (2012)	
c2Ntlc804	CAT CGT TTA CTG CTC GGA	Competidora <sup>4</sup>		Sorokin et al., (2012)	
Arquea	Sonda	Especificidad (5'-3')	Especificidad	FA <sup>1</sup>	Referencia
Arquea	Arch915	GTGCTCCCCCGCCAAATTCCT	Mayor parte de Archaea	10-35	Stahl y Amann (1991)
AOA	Thau1162	TTCTCCGCTCAGCGAC	Subgrupo Thaumarchaeota grupo I.1b	20	Mubmann et al., (2011)
	cThau1162	TTCTCCGCTCAGCGGC	Competidora <sup>4</sup>		Mubmann et al., (2011)
	Cren679	TTTTACCCCTTCCTTCCG	Candidatus Nitrosopumilus maritimus <sup>4</sup>	35	Labrenz et al., (2010)

<sup>1</sup> FA: Porcentaje de Formamida

<sup>2</sup> Fila no cubiertos por EUB 338, 338II y 338III

<sup>3</sup> Modificada con 4 bases LNA (Alonso et al., 2009)

<sup>4</sup> Sonda competidora sin marcar para aumentar la especificidad de la sonda correspondiente

### 3.5.4 Visualización de muestras y cuantificación con microcopía de epifluorescencia

Las muestras hibridadas fueron examinadas con un microscopio Olympus BX50 (Olympus, Paris) equipado con una lámpara de alta presión de mercurio de 100W y un juego de filtros U-MWB, U-MWIB y U-MWIG. Previamente a la observación con el microscopio las muestras fueron montadas con *Vectashield* (Vector Laboratories, USA). Este líquido se coloca entre el portaobjetos y el cubreobjetos para evitar la pérdida de fluorescencia de las sondas. Las observaciones se realizaron a 1000X para todas las sondas excepto para la sonda Nso1225 que se realizaron a 600X.

Para la determinación de la abundancia relativa de BOA y BON, de aquellas sondas que dieron señales positivas de hibridación, se fotografiaron aleatoriamente entre 20 y 30 campos por muestra. Por cada campo se capturaron entre 2 y 3 fotografías, una primera correspondiente a las bacterias nitrificantes diana (sonda específica), la segunda de toda la comunidad bacteriana (sonda EUBmix), y en ocasiones una tercera con el filtro doble banda que ayuda a diferenciar falsas señales de la sonda de hibridación. Las fotografías se realizaron con una cámara Olympus DP70 para fluorescencia.

Las imágenes fueron revisadas y procesadas con el programa Photoshop versión CS2 9.0, para eliminar falsas señales de la sonda de hibridación con el objetivo de que la cuantificación posterior fuera lo más precisa posible.

El procesamiento de imágenes para la cuantificación y el tratamiento de datos se realizó con el software desarrollado por Borrás (2008) para Matlab. Este software descompone las imágenes digitales tomadas en RGB a escala binaria para realizar el conteo de píxeles a partir del cual se calculan los porcentajes de abundancia relativa de las bacterias nitrificantes (Figura 29). El algoritmo del programa permite con un simple ajuste eliminar las partes de la imagen que no son de interés mediante los parámetros *Low\_in* y *Gamma\_in*. Con el primero se consigue eliminar la parte de la imagen que representa la fluorescencia de fondo (*background*) y establece un valor de 0 a 1, por debajo del cual es un falso positivo. El parámetro *Gamma\_in* representa la forma de la curva que describe la relación entre los valores de intensidad de la imagen original y la nueva imagen. Cuando *Gamma\_in* es menor a 1 la nueva imagen tendrá una intensidad más alta, es decir que será más brillante, si por el

contrario este parámetro es superior a 1 la nueva imagen será más oscura. El programa calcula el porcentaje y la desviación estándar del área ocupada por las bacterias nitrificantes en función del total de la comunidad bacteriana presente, así como el error de la medida. Este error es calculado dividiendo la desviación estándar por la raíz cuadrada de “n”, donde n es el número de campos examinados (Borrás, 2008).

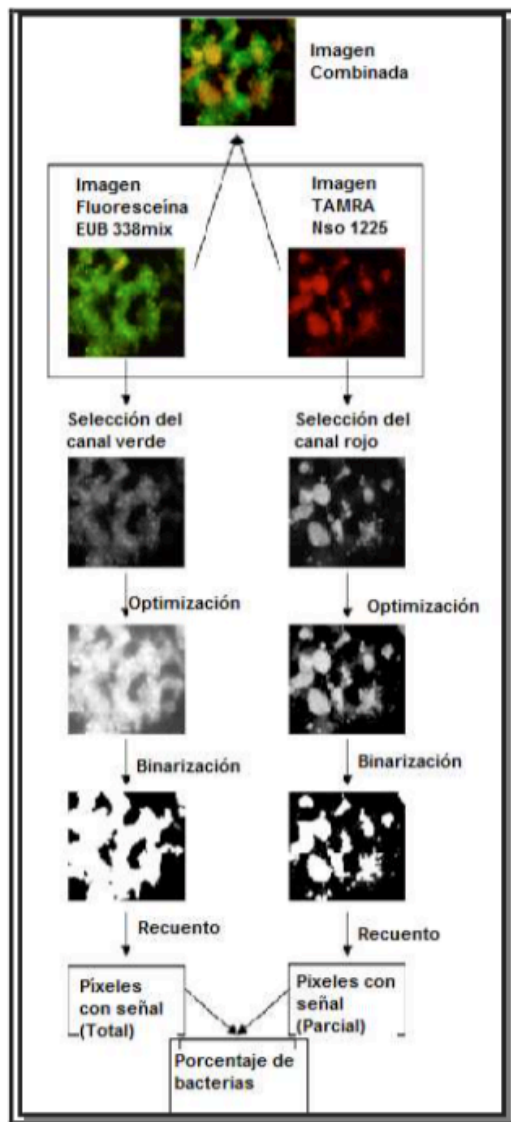


Figura 29. Flujo de procesos para la cuantificación de bacterias nitrificantes

### 3.6 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE POBLACIONES NITRIFICANTES MEDIANTE TÉCNICAS METAGENÓMICAS

Para el análisis de muestras mediante técnicas metagenómicas se emplearon las muestras procedentes de la EDAR ML. Durante un año y con una frecuencia quincenal las muestras fueron analizadas con secuenciación dirigida del gen 16S rRNA de segunda generación mediante la plataforma de secuenciación Illumina®. De las 25 muestras analizadas, 9 de ellas fueron también analizadas mediante secuenciación dirigida del gen 16S rRNA de tercera generación mediante la tecnología de PacBio.

#### 3.6.1 Extracción y cuantificación del DNA

Se extrajo por duplicado el DNA total a partir de 1 ml de muestra de fango activo. Para la extracción del DNA primero se realizó la lisis celular con el equipo FastPrep® -24 a 6 m/seg (3700rpm) durante 40 segundos, seguido de enfriamiento de la muestra a 4°C durante 3 minutos, y repetición del tratamiento a 6 m/seg durante 40 segundos. A continuación, el DNA se extrajo mediante el kit FastDNA SPIN® para suelo (MP Biomedicals, Solon, OH, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. La muestra se eluyó con agua de grado biología molecular en un volumen final de 50 µl. Como la muestra se extrajo por duplicado el volumen final de muestra de DNA fue de 100 µl. Una vez obtenido el DNA, se eliminaron los inhibidores presentes mediante el kit comercial One-Step PCR Inhibitor Removal Kit (Zymo Research, Irvine, CA, EEUU) que se utiliza para eliminar los inhibidores de la muestra que puedan afectar a reacciones enzimáticas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A continuación, se midió la concentración de DNA mediante fluorescencia con el fluorímetro Qubit™ (Thermo Fisher Scientific) y la relación 260/280 mediante espectrofotometría de UV con el equipo NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific, Washington, DE, EEUU), para determinar la calidad del DNA extraído.

#### 3.6.2 Amplificación y secuenciación masiva de genes ribosomales

La secuenciación dirigida del gen 16S rRNA se llevó a cabo mediante dos tecnologías diferentes, MiSeq Illumina y SMRT de PacBio.

### *Secuenciación dirigida del gen 16S rRNA de segunda generación. Plataforma Illumina*

La secuenciación se llevó a cabo en la plataforma de secuenciación Illumina MiSeq del servicio de secuenciación y bioinformática de LifeSequencing S.L., (Paterna, Valencia, España), donde también se realizó el proceso de construcción de las librerías de amplicones de DNA. Las regiones hipervariables V3-V4 del gen 16S rRNA fueron amplificadas con los cebadores 341F 5'-CCT ACG GGN GGC WGC AG-3' (Herlemann *et al.*, 2011) y 802R 5'- TAC NVG GGT ATC TAA TCC-3' (Claesson *et al.*, 2009). Las librerías se generaron empleando los iniciadores 341F y 802R, siguiendo las instrucciones descritas en la guía de preparación de las librerías de DNA para secuenciar mediante metagenómica en el secuenciador Illumina MiSeq (Amplicon P.C.R., 2013). Las muestras fueron cargadas en la plataforma MiSeq de Illumina en modo paired-end de 300 pb.

Se obtuvieron 2 juegos de secuencias para cada una de las muestras, un fichero con las secuencias secuenciadas en una dirección (R1), y otro fichero con las secuencias secuenciadas en la otra dirección (R2). Cada par de secuencias se sometió a solapamiento entre ellas, para la obtención de una secuencia única y completa, con el programa PEAR V.0.9.1 (<http://www.exelixis-lab.org/web/software/pear>) con los parámetros por defecto excepto el parámetro de solapamiento mínimo entre las secuencias de cada extremo que se fijó en 70 nts, obteniendo al final un único fichero con el total de secuencias solapadas. Una vez obtenidas las secuencias solapadas, con el objetivo de eliminar las secuencias de baja calidad, se eliminaron los extremos de secuencias que no llegaron a la calidad Q20. Con el programa CUTADAPT versión 1.8.1. se procedió a eliminar restos de cebadores de amplificación y se seleccionaron secuencias de una longitud mayor de 200pb en las secuencias 16S, ya que las secuencias de menor tamaño tienen mayor probabilidad de asociarse erróneamente a grupos taxonómicos. Para el análisis de las secuencias obtenidas en la secuenciación se utilizó la plataforma de acceso libre QIIME 1.9.1 (Caporaso *et al.*, 2010) y comandos adicionales de la máquina virtual Microbiome Helper (Comeau *et al.*, 2017). El primer paso en el tratamiento bioinformático de los datos fue la comprobación de la calidad de las secuencias mediante la herramienta FastQC, ya que el servicio de secuenciación proporcionó las secuencias unidas con el procedimiento descrito con anterioridad. A continuación, mediante la herramienta FASTX-Toolkit v0.0.14 se eliminaron las secuencias de menos de 200 pb y aquellas con una calidad menor de Q30 en el 90% de los casos (Gordon, 2009). Para la eliminación de las secuencias potencialmente

quiméricas se utilizó VSEARCH v1.11.1 (Rognes *et al.*, 2016). Las secuencias restantes fueron procesadas mediante el comando open reference de QIIME, aplicando los métodos SortMeRNA v2.0 (Kopylova *et al.*, 2012) y SUMACLUST v1.0.00 (Mercier *et al.*, 2013) para los pasos de agrupamiento en OTUs basados en una referencia y de novo, respectivamente. Las OTUs se definieron al 97 % de la similitud de secuencia, empleando la base de datos SILVA r132 (Quast *et al.*, 2013).

#### *Secuenciación dirigida del gen 16S rRNA de segunda generación. Plataforma PacBio*

La comunidad microbiana de la EDAR ML fue analizada mediante secuenciación de tercera generación. En este caso, la secuenciación se llevó a cabo en la plataforma de secuenciación PacBio del servicio de secuenciación y bioinformática GATC Biotech (Eurofins Genomic Company), donde se realizó el proceso de construcción de las librerías de amplicones de DNA.

Para la amplificación de las regiones V1-V8 del gen 16S rRNA se utilizaron los iniciadores 27F y BS-R407 (Tabla 6). Las librerías de DNA se prepararon según las características indicadas para secuencias mediante metagenómica en el secuenciador.

Tabla 6. Secuencias de los iniciadores 27F y BS-R407

Región Variable	Iniciador	Secuencia	Tamaño	Referencia
V1-V8	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1381 pb	Klindworth <i>et al.</i> , 2013
	BS-R1407	GACGGGCGGTGWGTRC		

En la primera parte del análisis bioinformático los datos fueron procesados para la búsqueda y eliminación de quimeras. Para ello se utilizó la herramienta UCHIME (Edgar *et al.*, 2011) utilizando una base de datos de referencia de genes de ARNr 16S de longitud completa, buena calidad y no quimérica. Las secuencias únicas no quiméricas obtenidas tras este análisis se sometieron a un análisis BLASTn (Altschul *et al.*, 1990). Para ello se utilizaron secuencias de referencia de rRNA 16S no redundantes con un E-value de corte de 1e-06. Las secuencias de rRNA del gen 16S de referencia se obtuvieron del Ribosomal Database Project (Cole *et al.*, 2008) (actualización 11 de septiembre de 2016).

de  $1e-06$ . Las secuencias de rRNA del gen 16S de referencia se obtuvieron del Ribosomal Database Project (Cole *et al.*, 2008) (actualización 11 de septiembre de 2016).

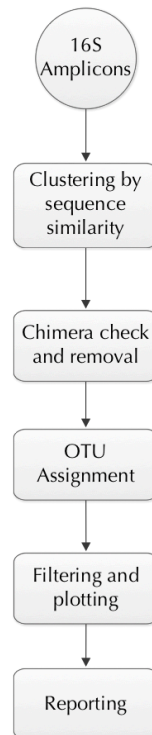


Figura 30. Secuencia de trabajo en el tratamiento bioinformático

La clasificación taxonómica se basó en la Taxonomía del NCBI (Federhen, 2011) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>). Para el filtrado, excepto el E-value de corte ( $1e-06$ ), no se utilizaron otros umbrales durante el análisis de BLAST. Se consideraron todos los resultados de referencia a la base de datos de 16S rRNA y se aplicaron filtros específicos a los resultados para eliminar los falsos positivos. Finalmente, la clasificación de las secuencias de OTU fue normalizada para calcular las abundancias relativas.

### 3.7. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD NITRIFICANTE MEDIANTE RESPIROMETRÍA.

Los análisis respirométricos fueron realizados con el objetivo de valorar la actividad nitrificante en las muestras de fango activo. Para ello se analizaron 34 muestras de fango activo de la EDAR ML.

### 3.7.1 Equipo de respirometría

Para la realización de los ensayos respirométricos se ha utilizado un respirómetro *BM-Advance Pro* de SURCIS S.L., Barcelona, España. Este equipo posee un reactor de 1 litro de capacidad, un sistema de agitación mediante hélice, un mecanismo de aireación a través de un difusor cerámico de burbuja fina y un sistema de bombeo para la recirculación interna del licor mezcla (Figura 31). El respirómetro está equipado con un sistema de control automático del pH y de la temperatura por medio de un sistema *peltier* y calefactor integrado en el propio analizador BM. El equipo utiliza una sonda *EasyFerm Plus PHI VP 120 Pt100* (HAMILTON®) y un oxímetro de electrodo tipo *Clark* para el control de estos parámetros, respectivamente.

El respirómetro está conectado a un ordenador, el cual procesa las señales de los sensores y calcula, mediante el software integrado al equipo (*BM-Respirometer*, SURCIS, S.L., Barcelona, España), los resultados de tasas de respiración y variables de control.

#### *Operación del equipo de respirometría.*

En función de la variable a analizar se realizaron dos tipos de ensayos: los ensayos en modo estático y los ensayos en modo dinámico.

Los ensayos en modo estático o modo OUR comprenden dos etapas, en la primera de ellas se mantiene la recirculación interna, la aireación y agitación encendida para fijar el oxígeno inicial de referencia ( $C_b$ ). El ensayo se inicia en la segunda etapa, donde se suspenden la aireación y la recirculación y se mantiene únicamente la agitación. A partir de este momento, el oxímetro registra automáticamente el descenso del oxígeno disuelto ( $C_s$ ) en el reactor, debido al consumo por de biomasa presente en el licor mezcla. Esto permite conocer la pendiente de caída del oxígeno, que se corresponde con la tasa de respiración global endógena de la biomasa ( $OUR_{end}$ ), la cual calcula el programa del respirómetro de manera automática haciendo uso de la ecuación 3.1.,

$$OUR = \frac{C_b - C_s}{t} \quad (3.1.)$$

donde  $C_b$  es la concentración de oxígeno base;  $C_s$  la concentración de oxígeno final y  $t$  el tiempo transcurrido desde la posición  $C_b$  a  $C_s$ .



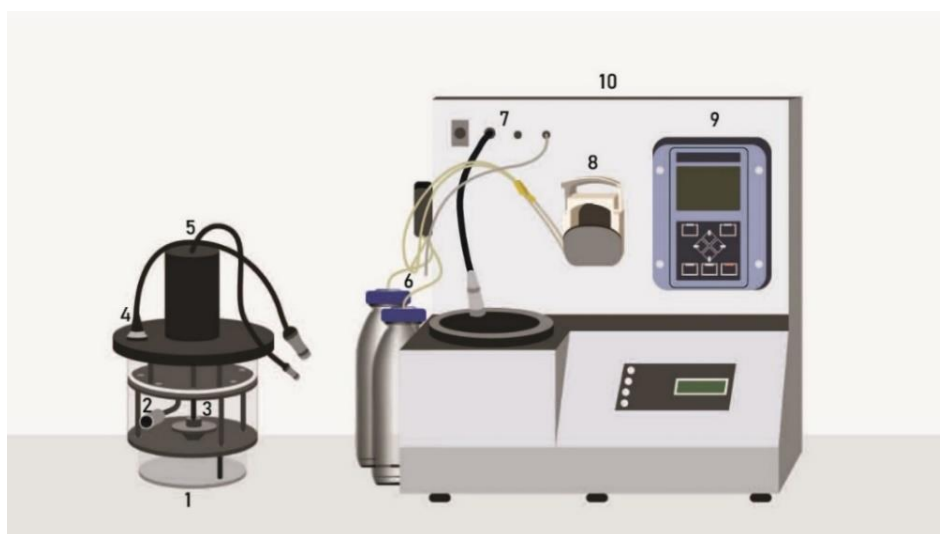


Figura 31. Representación esquemática del respirómetro BM-Advance Pro.

(1) vaso reactor, (2) difusor de aire, (3) hélice de agitación, (4) sensores, (5) motor de agitación, (6) sistema de almacenamiento de reactivos y bombeo para el control del pH, (7) conectores de los sensores, (8) bomba peristáltica para recirculación interna, (9) panel de control, (10) analizador.

Los ensayos en modo dinámico se caracterizan por mantener la aireación en continuo durante todo el ensayo. Este sistema, abierto, con oxigenación permanente y provisto de recirculación entre la parte superior del reactor y la zona de medidas, determina el OD en la fase líquida de modo dinámico. En este ensayo se parte del nivel de oxígeno de referencia ( $C_b$ ) previo a la adición de una determinada cantidad de sustrato. Una vez se ha establecido el  $C_b$  y se adiciona el sustrato el programa genera un respirograma formado por una medida continuada de valores de la tasa de respiración dinámica ( $R_s$ ). Esta tasa depende de la demanda de oxígeno provocada por el sustrato añadido.  $R_s$  se calcula en función de la diferencia entre la línea de OD base fijada al inicio de cada experimento y la obtenida tras la adición de un sustrato, según la ecuación 3.2.

$$R_s = f_{rs} \cdot f_t \cdot (C_b - C_s) \quad (3.2)$$

donde,  $R_s$  es tasa de respiración exógena (mg/L · h);  $f_{rs}$ , factor de calibración (valor dependiente del coeficiente específico de transferencia del oxígeno en función de la velocidad de recirculación en el reactor);  $f_t$ : factor dinámico (se determina en fábrica y depende del caudal de la bomba y volumen de la zona inferior del vaso reactor);  $C_b$ : Línea

base (oxígeno inicial que corresponde al estado de respiración endógena (mg/l));  $C_s$ : concentración de oxígeno resultante de la oxidación del sustrato (mg/l).

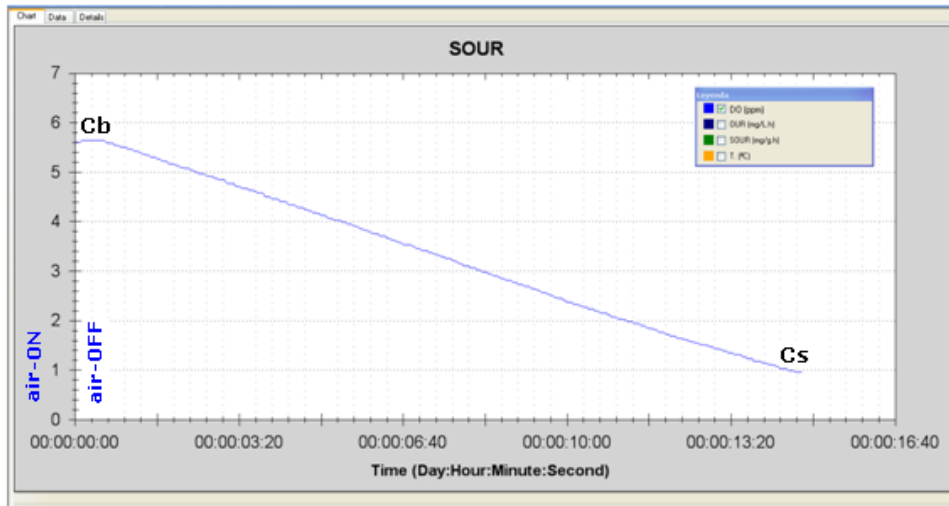


Figura 32. Representación gráfica del cálculo de la tasa de respiración endógena por respirometría.

Para el control del pH durante los ensayos se utilizó una disolución de NaOH 0,1M y una disolución de HCl 0,1M. Las cuales son adicionados de forma automática por el equipo *BM-Advance Pro* mediante una bomba peristáltica.

### 3.7.2 Análisis respirométricos.

#### *Preparación de las muestras para respirometría.*

Previamente al inicio de los ensayos respirométricos las muestras fueron sometidas a un período de aireación de entre 12 y 24 horas con el objetivo de asegurar las condiciones endógenas del fango. Transcurrido este período las muestras fueron filtradas con una malla metálica de 3 mm con el objetivo de retirar los sólidos de mayor tamaño. A continuación 500 ml de muestra fueron diluidos en 500 ml de agua potable libre de cloro residual, para asegurar una concentración de SSLM entre 2,5 y 5 mg/L.

Previamente al inicio de cada uno de los análisis se programó un ensayo en modo de operación dinámico para comprobar las condiciones endógenas de fango y adaptar el fango a la temperatura y pH determinados, y asegurar una línea base de oxígeno estable en

el caso de los ensayos en modo de operación dinámico. Los análisis respirométricos de cada una de las muestras procesadas fueron programados para mantener las condiciones de temperatura y pH de la EDAR en el momento del muestreo. Estas condiciones se mantuvieron durante un periodo mínimo de 30 minutos antes de inicio de los ensayos.

### *Medida de la tasa de respiración endógena de bacterias heterótrofas y autótrofas*

Para el análisis de la tasa de respiración endógena del total de la población bacteriana presente en el fango activo se utilizó fango activo diluido en estado de respiración endógena, acondicionado al pH y temperatura del proceso. Se programó un ensayo en modo de operación estático en el que se introdujeron como variables la concentración de SSVLM, la Tr y el pH. Los ensayos se dieron por finalizados cuando se hubo consumido todo el oxígeno presente en el reactor. En este momento se pudo obtener la tasa de consumo de oxígeno en condiciones endógenas ( $OUR_{end}$ ), la cual calcula el programa del respirómetro de manera automática. A partir de los valores de  $OUR_{end}$  se calculó la tasa de consumo de oxígeno específica ( $SOUR_{end}$ ) según la ecuación 3.3.

$$SOUR = \frac{OUR}{SSVLM} \quad (3.3)$$

Para determinar la tasa de respiración endógena de las bacterias heterótrofas ( $OUR_{end,H}$ ) y la correspondiente tasa específica de respiración ( $SOUR_{end,H}$ ), se partió de un fango con la biomasa autótrofa inhibida y se procedió a realizar el mismo procedimiento que para la obtención de  $OUR_{end}$ . La inhibición de la biomasa autótrofa se realizó tal y como se describe posteriormente.

La tasa de respiración endógena de las bacterias autótrofas ( $OUR_{end,A}$ ) y la correspondiente tasa específica de respiración ( $SOUR_{end,A}$ ) se calculó como la diferencia entre los valores de  $OUR_{end,A}$  y  $OUR_{end,H}$  (Figura 33).

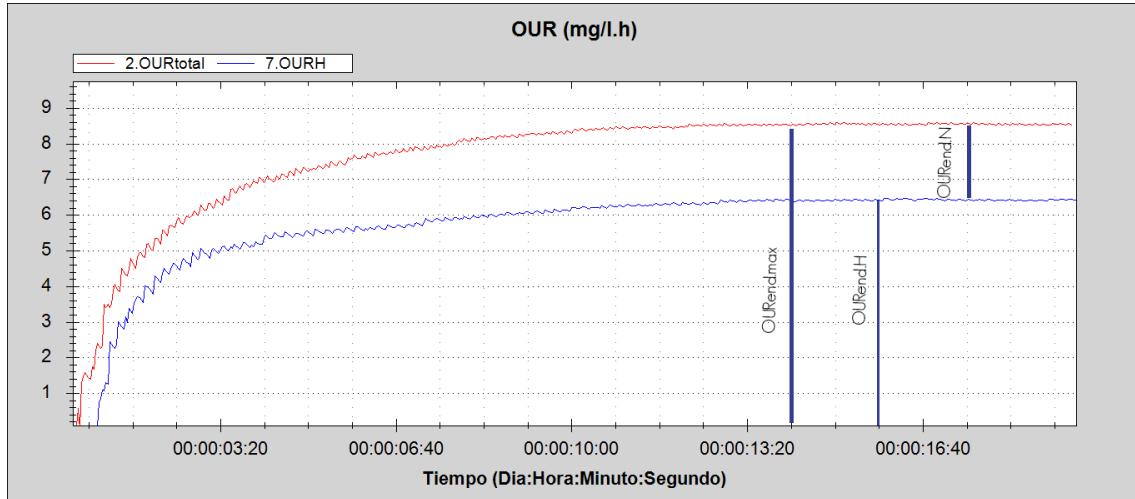


Figura 33. Medida de la tasa de respiración endógena autótrofa y heterótrofa.

*Medida de la tasa de respiración por consumo de amonio.*

Para el análisis de la tasa de respiración por consumo de amonio ( $R_s$ ) se utilizó fango activo diluido en estado de respiración endógena, acondicionado al pH y temperatura del proceso. Se programó un ensayo en modo de operación dinámico en el que se introdujeron como variables la concentración de SSVLM, la  $T_r$ , el pH, el volumen de sustrato utilizado, la intensidad de la aireación y la velocidad de la bomba peristáltica de recirculación del fango. Para determinar la respiración exógena por consumo de  $N-NH_4$  se utilizó una solución de  $ClNH_4$  a razón de 70 mg  $ClNH_4/g$  SSVLM en 10 ml de agua destilada. Los ensayos se dieron por finalizados cuando la tasa de respiración se volvió asíntota respecto al eje horizontal tras alcanzar su valor máximo.

A partir del valor de  $R_s$  obtenido se calculó la tasa de respiración específica ( $R_{sp}$ ) y la tasa de nitrificación (AUR),

$$R_{SP} = \frac{R_{SN}}{SSVLM} \quad (3.2)$$

$$AUR = \frac{R_s}{4,57} \quad (3.3)$$

donde 4,57 son los mg de  $O_2$  necesarios estequiométricamente para la oxidación de cada mg de  $N-NH_4^+$ .

### *Inhibición de la biomasa autótrofa.*

Para inhibir la biomasa autótrofa se utilizó Allil tiourea que fue añadida al fango activo diluido en estado de respiración endógena, acondicionado al pH y temperatura del proceso. Se programó un ensayo en modo de operación dinámico en el que se introdujeron como variables la concentración de SSVLM, la  $T^a_r$ , el pH, el volumen de sustrato utilizado, la intensidad de la aireación y la velocidad de la bomba peristáltica de recirculación del fango. Se adicionaron 2 g  $ClNH_4$  en 10 ml de agua destilada al iniciar el ensayo y se monitorizó  $R_s$ . Cuando se estableció una meseta en  $R_s$  se procedió a adicionar sucesivamente 1 ml de una solución de Allil tiourea (1mg Allil Tiourea en 1 ml de agua) hasta que se observó un descenso sensible de  $R_s$ . Los ensayos se dieron por finalizados cuando la tasa de respiración fue 0.

## 3.8 DETECCIÓN DE LA BIOMASA ACTIVA MEDIANTE TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN DEL ATP

Para llevar a cabo la cuantificación del ATP se utilizó la ATPmetría ATP2G®. Para ello se tomaron diferentes volúmenes de fango activo: 1.0 mL para cuantificar el ATPt y 2 volúmenes de 100  $\mu$ L de fango para cuantificar el ATPd, según las instrucciones del fabricante (LuminUltra™).

La cuantificación del ATP se llevó a cabo mediante la medida de la luminiscencia, generada por su reacción con el complejo luciferina-luciferasa. Esta reacción se lleva a cabo mediante los kits de reactivos adecuados para cada tipo de agua. En el caso de las aguas residuales se utiliza el kit Quench Gone 21W™ (LuminUltra).

Según las instrucciones del fabricante, una vez llevada a cabo la reacción se determinó la luminiscencia generada. Para la medida de la luminiscencia se utilizó un fotómetro (Photonmaster luminometer de LuminUltra® New Brunswick, Canadá).

Los resultados de la intensidad de la luz emitida medida en URL se convirtieron en ng ATP/mL usando el patrón de ATP, Ultra Check 1.™ y el software Lumi Capture Lite.

Mediante el kit Quench Gone21-W™ se midieron los siguientes parámetros:

- ATP total (ATPt): suma de ATP intra y extracelular

- ATP extracelular (ATPd): ATP libre o combinado procedente de microorganismos lisados.
- ATP intracelular (ATPc): ATP contenido en los microorganismos vivos.

$$\text{ATPc (ng/mL)} = \text{ATPt (ng/ml)} - \text{ATPd (ng/ml)} \quad (3.4)$$

donde, ATPc es el ATP intracelular, ATPt el ATP total y ATPd el ATP disuelto en el medio.

- Índice de estrés de la biomasa (BSI) que representa el nivel de estrés al que está sometida la biomasa.

$$\text{BSI\%} = \text{ATPd/ATPt} \quad (3.5)$$

- Los sólidos suspendidos activos del licor mezcla (SSVALM) se calculan a partir del factor de conversión calculado por Tchobanoglous *et al.*, (2003). Este factor considera que la biomasa contiene aproximadamente el 50% de carbón en peso seco.

$$\text{SSVALM (mg/L)} = 0.5 \cdot \text{ATPc (ng/mL)} \quad (3.6)$$

### 3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

En análisis de datos se dividió en dos bloques, en el primero de ellos se analizaron los datos de abundancia relativa obtenidos por FISH en las EDAR QB, CX, CT y DN para evaluar la dinámica poblacional de las comunidades de bacterias nitrificantes. En el segundo bloque se analizaron los datos de abundancia relativa obtenidos por FISH y técnicas de metagenómicas, así como la actividad de las bacterias nitrificantes determinada mediante respirometría en la EDAR ML y los datos de la medida de ATP.

En el primer bloque se analizan las relaciones entre las variables ambientales, los rendimientos de eliminación del nitrógeno y la abundancia de las diferentes especies de bacterias nitrificantes determinada mediante la técnica FISH de los 5 reactores correspondientes a las 4 EDAR mencionadas. Para el análisis estadístico se consideraron tres conjuntos de variables: las variables ambientales (variables fisicoquímicas y operacionales), las variables que hacen referencia al rendimiento de eliminación de las

diferentes fracciones del nitrógeno, y las variables biológicas (abundancia relativa de bacterias nitrificantes). Cada uno de los conjuntos de variables fue sometido a un análisis descriptivo y un tratamiento preliminar. A continuación se realizó un análisis exploratorio empleando rutinas multivariantes con enfoque no paramétrico y basadas en matrices distancia. Finalmente se realizó un análisis de interpretación ambiental mediante modelos lineales basados en la distancia (DISTLM) para relacionar los diferentes conjuntos de variables. En este caso la matriz de variables explicativas fue construida con 21 variables fisicoquímicas y 5 variables operacionales del proceso.

En el segundo bloque se procedió de manera similar para el tratamiento de los resultados de la abundancia de bacterias nitrificantes en la EDAR ML y su actividad. A continuación se analizaron los resultados más correlacionados con el rendimiento de eliminación de nitrógeno de la EDAR ML y las variables ambientales.

### 3.9.1 Análisis descriptivo y tratamiento preliminar de los datos

Fueron exploradas diferentes opciones para la transformación de las variables biológicas (ninguna transformación, raíz cuadrada, raíz cuarta, Log (X+1) y transformación binaria). La elección de la transformación se realizó a partir del cálculo de los coeficientes de correlación de Spearman entre las matrices distancia e 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). También se utilizó la rutina BIO-ENV con el objetivo de relacionar la matriz biológica y la matriz de variables ambientales, con el objetivo de examinar aquellas transformaciones que maximizan la correlación en la rutina (Clarke *et al.*, 2014). En base a estas herramientas se seleccionó 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 fueron 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 fueron realizadas con PRIMER v7 (Clarke y 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 y Curtis, 1957), así como las correspondientes a las variables ambientales transformadas y estandarizadas, utilizando la distancia euclídea.

### 3.9.2 Análisis exploratorio

El escalamiento multidimensional no métrico (nMDS) fue empleado para identificar los patrones de distribución de las variables biológicas y ambientales, según los siguientes factores: espacial (reactor) y temporal (estaciones). 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).

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

### 3.9.3 Análisis de interpretación ambiental

El análisis de correlación no paramétrico entre matrices biológicas y fue aplicado para encontrar las combinaciones de variables relacionadas con la eliminación del nitrógeno que mejor explican la dinámica poblacional las bacterias nitrificantes. Previa a la aplicación de la rutina 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).



Con el objetivo de evaluar la contribución de las variables ambientales a la variabilidad observada en las poblaciones de bacterias nitrificantes y su actividad en los casos correspondientes, 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 R<sup>2</sup>*, AICC (*Akaike Information Criterion corrected*) y BIC (*Bayesian Information Criterion*), usando 999 permutaciones. El criterio AICC 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. El análisis de redundancia basado en la distancia (dbRDA) fue usado para construir una ordenación restringida en los valores ajustados desde el mejor modelo (Anderson *et al.*, 2008). Las variables analizadas fueron representadas como burbujas donde el valor de la variable está representado por el tamaño de burbuja (*bubble plots*). La longitud y dirección de las relaciones entre las variables explicativas y las variables biológicas de los valores de Pearson >0,40 fueron presentados como vectores para visualizar la ordenación de las variables respuesta frente a las variables explicativas, aunque solamente se consideraron significativos los valores de Pearson >0,50.

La construcción de los modelos lineales basados en la distancia (DISTLM-dBRDA) fueron realizados utilizando PRIMER v7 (Clarke y Gorley, 2015).



## 4. Resultados

---



#### 4.1 ESTUDIO DE LA DINÁMICA DE LAS POBLACIONES DE BACTERIAS NITRIFICANTES EN LAS EDAR CT, CX, DN Y QB.

En el siguiente apartado se muestran los resultados obtenidos tras el análisis de las 112 muestras recogidas en 4 de las EDAR analizadas en esta tesis: CT, CX, DN y QB.

##### 4.1.1 Resultados de la aplicación de la técnica FISH para la identificación y cuantificación de bacterias nitrificantes en las EDAR CT, CX, DN y QB.

Los resultados de la aplicación de la técnica molecular FISH fueron visualizados mediante microscopía de eplifluorescencia. Se detectaron resultados positivos en 3 de las 5 sondas utilizadas para la identificación de las BOA (Nso1225<sub>LNA</sub>, Nmo218 y NEU) y 3 de las 4 sondas utilizadas para la identificaron de las BON (Ntspa662, Ntoga122 y NIT3). No se observaron señales positivas de hibridación en ninguna de las 2 sondas utilizadas para las AOA (Thau1162 y Cren679). La Figura 34 muestra las abundancias promedio determinadas mediante FISH.

La aplicación de la técnica FISH permitió la identificación de comunidades de BOA de la clase betaproteobacteria (sonda Nso1225<sub>LNA</sub>). Mediante microscopía de epifluorescencia se observaron los típicos agregados celulares densos característicos de este grupo de BOA (Figura 35 a), con morfologías celulares ovals y esféricas. *Nitrosomonas* fue el género dominante responsable de la oxidación del amonio en todas las EDAR analizadas. Este género presentó resultados positivos en el 100% de las muestras procesadas, su abundancia promedio fue del 3% y estuvo comprendida entre el 6% y el 1%. Esta comunidad estuvo principalmente representada por especies del linaje de *N. oligotropha*, identificadas con la sonda Nmo218. Esta sonda permitió la observación microscópica de los agregados celulares de *N. oligotropha*, los cuales fueron compactos y esféricos o irregulares y más abiertos en ciertas ocasiones. Estas células presentaron principalmente morfologías ovals (Figura 35b). La sonda Nmo218 presentó resultados positivos en un 92% de las muestras analizadas. El linaje de *N. oligotropha* representó un promedio del 49% respecto al total de *Nitrosomonas* detectadas por la correspondiente

sonda de género; su abundancia promedio fue del 1,5% (Figura 34) y estuvo comprendida entre el 0% y el 5%. Los miembros del grupo de *Nitrosomonas* halotolerantes (sonda NEU) fueron detectados en un 58% de las muestras. Este grupo, que presentó abundancias relativas menores, fue detectado en todas las EDAR exceptuando la EDAR QB. El grupo de *Nitrosomonas* halotolerantes representó un 16% del total de las *Nitrosomonas* detectadas. Su abundancia promedio fue <1% y estuvo comprendida entre el 0% y el 2% (Figura 34). Las hibridaciones con la sonda NEU mostraron frecuentemente agregados celulares no homogéneos morfológicamente. El tamaño y la densidad de estos agregados fue menor que en el caso de la sonda Nmo218, y se observaron con mayor frecuencia en la superficie del flóculo (Figura 35c). El linaje *Nitrosomonas europaea-entrophae* (sonda Nse1472) no presentó señales de hibridación positivas en ninguno de los reactores estudiados. Así mismo, tampoco se observó la presencia de la especie *Nitrosococcus mobilis* (sonda NmV). Estos resultados junto con los de la sonda NEU indican que las especies hibridadas con esta última sonda no se corresponden con las especies *N. mobilis*, *N. halophila*, *N. europaea* y *N. entrophae*.

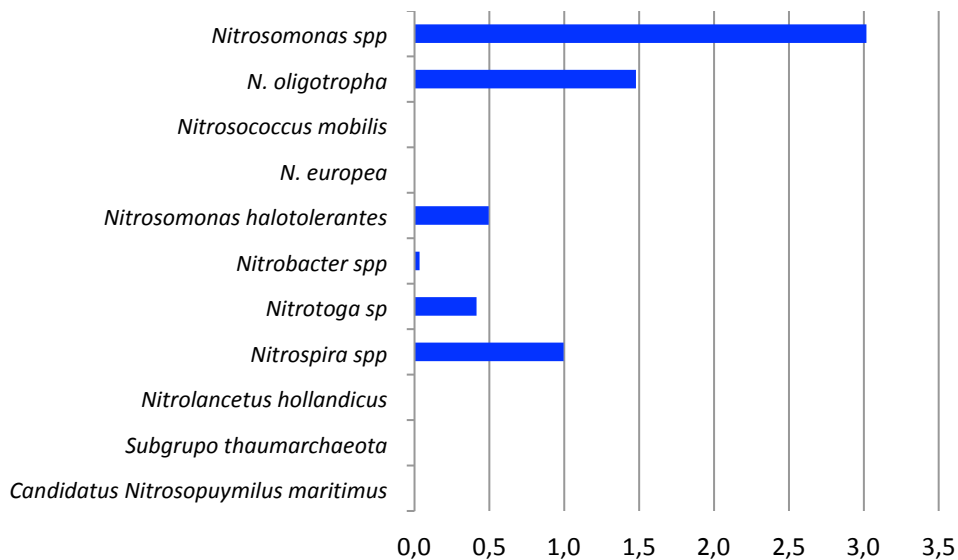


Figura 34. Diagrama del promedio de la abundancia relativa de las bacterias oxidantes del amonio y nitrito en las EDAR CT, CX, DN y QB.

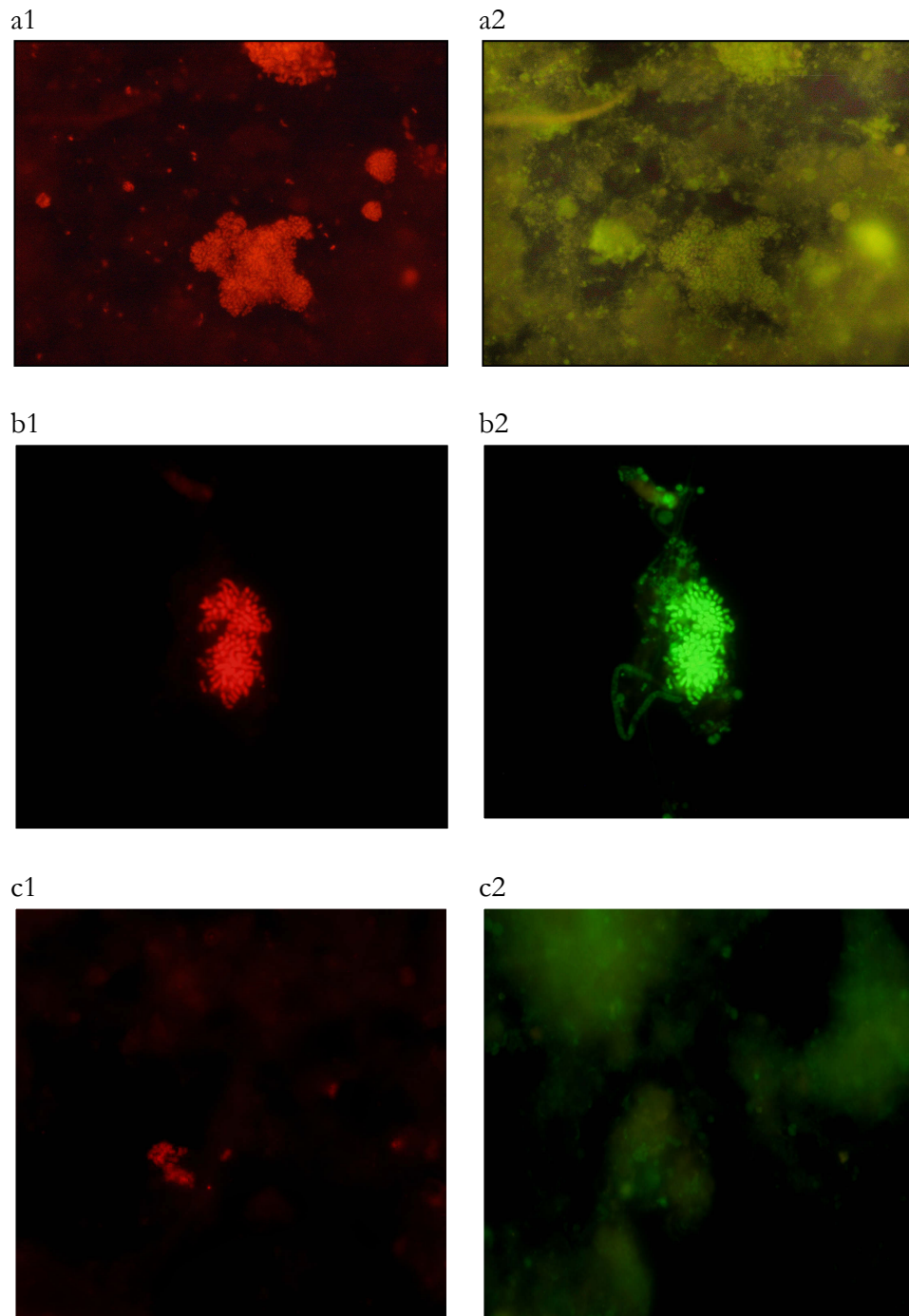


Figura 35. Bacterias oxidantes del amonio más frecuentes en las EDAR CT, CX, DN y QB. a1) sonda Nso 1225, a2) Mismo campo sondas EUB338mix, 600X; b1) sonda Nmo 218, b2) Mismo campo sondas EUB338mix, 1000X; c1) sonda NEU, c2) Mismo campo sondas EUB338mix, 1000x.

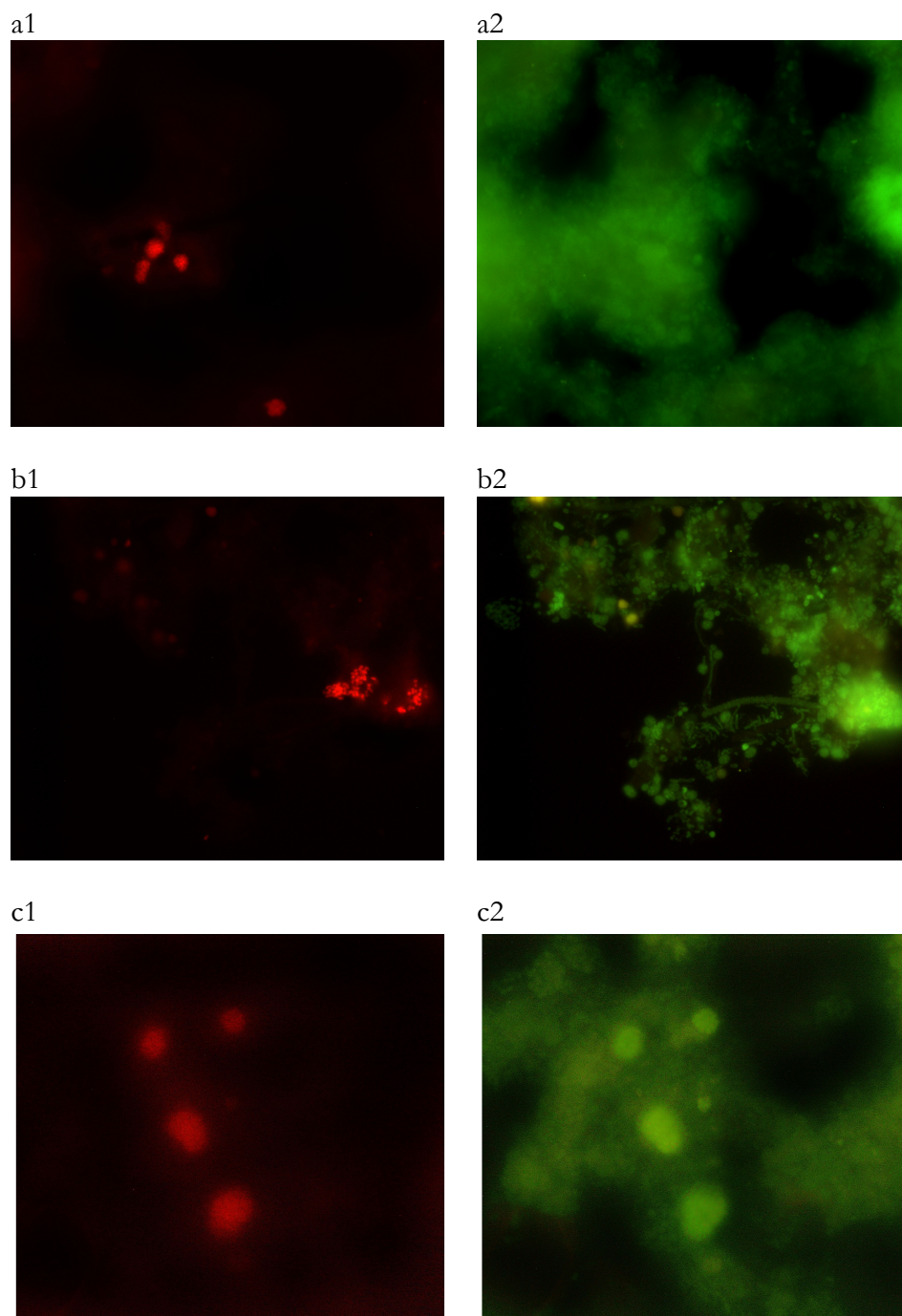


Figura 36. Bacterias oxidantes del nitrito más frecuentes en las EDAR CT, CX, DN y QB. a1) sonda Ntspa662, a2) Mismo campo sondas EUB338mix, 600X; b1) sonda Ntog122, b2) Mismo campo sondas EUB338mix, 1000X; c1) sonda NIT3, c2) Mismo campo sondas EUB338mix, 1000x.



Los géneros dominantes responsables de la oxidación del nitrito fueron *Nitrospira* (sonda Ntspa662) en las EDAR CX, DN y QB y *Nitrotoga* (sonda Ntoga122) en los reactores CT1 y CT2. El género *Nitrospira* presentó una morfología homogénea con forma característica de pequeños agregados celulares densos de forma esférica (Figura 36 a). Este género mostró resultados positivos en un 66% de las muestras analizadas y representó un promedio del 71% respecto al total de total de BON detectadas. La abundancia promedio de *Nitrospira* fue del 1% (Figura 34) y estuvo comprendida entre el 0 y 5%. El género *Nitrotoga* presentó resultados positivos en un 49% de las muestras analizadas. Sus agregados fueron de mayor tamaño que los de *Nitrospira*, poco densos, presentaron formas irregulares y estuvieron formados por células ovals y esféricas (Figura 36 b). Este género representó un promedio del 29% respecto al total de total de BON detectadas; su abundancia promedio fue menor del 1% (Figura 34) y estuvo comprendida entre el 0 y 3%. El género *Nitrobacter* (sonda NIT3) fue identificado únicamente en la EDAR DN. Este género mostró una morfología homogénea, de pequeños grupos de células grandes (Figura 36c). La presencia de *Nitrobacter* fue observada en un 6,3% de las muestras y representó el 2% de la BON detectadas. Su abundancia relativa estuvo comprendida entre 0 y <1%. No se observaron señales positivas de la especie *Nitrolancetus hollandicus* (sonda Ntlc804) en ninguna de las EDAR estudiadas. Estos resultados dieron origen a un porcentaje promedio de abundancia relativa de BON del 1% en el conjunto de los reactores estudiados.

La concentración total de biomasa nitrificante estuvo comprendida en un rango del 1 al 7%, con un valor promedio del 4%, del cual el 1% representa el promedio de la biomasa total de BON y el 3% el promedio de la biomasa total de BOA.

#### *Distribución temporal y espacial de la población de bacterias nitrificantes en las EDAR CT, CX, DN y QB.*

En este apartado se analiza la distribución temporal y espacial de las bacterias nitrificantes (BN), determinada mediante la técnica molecular FISH, en las 112 muestras tomadas de los reactores de las EDAR CT, CX, DN y QB. En la Tabla 7 se resumen los datos de la cuantificación de las diferentes especies de variables nitrificantes.

En la Figura 37 y la Figura 38 se observa la dinámica poblacional de las BN en los reactores CT1 y CT2, respectivamente. *Nitrosomonas* fue el género dominante responsable

de la oxidación del amonio en ambos reactores y presentó resultados positivos en un 100% de las muestras analizadas. En CT1 su abundancia promedio fue del 3% y estuvo comprendida entre el 1 y 5%. En el caso de CT2 su abundancia promedio fue del 3% y estuvo comprendida entre el 2 y 5%. *N. oligotropha* presentó resultados positivos en el 87% de las muestras analizadas en CT1, mientras que en CT2 se obtuvieron resultados positivos de esta especie en el 100% de las muestras. En CT1 su valor promedio fue del 1% y en CT2 del 2%; su abundancia estuvo comprendida entre el 0 y 4% y entre el 0 y 3%, respectivamente. El grupo de *Nitrosomonas* halotolerantes fue detectado en un 48% de las muestras de CT1 y en un 74% de las muestras de CT2. Sus abundancias promedio fueron menores del 1% en ambos reactores, y estuvieron comprendidas entre 0 y 2% para CT1 y entre 0 y 1% para CT2.

Tabla 7. Media (M), desviación estándar (DE), valor máximo (Mx) y valor mínimo (Mn) de la abundancia relativa (%) de bacterias nitrificantes.

Variables biológicas	EDAR CT1				EDAR CT2				EDAR DN			
	M	DE	Mx	Mn	M	DE	Mx	Mn	M	DE	Mx	Mn
<i>Nitrosomonas spp.</i>	2,6	1,5	5	1	3,2	0,9	5	2	3,0	0,8	5	2
<i>N. oligotropha</i>	0,8	1,0	4	0	1,5	0,8	3	0	1,3	0,6	3	0
<i>N. halophila-eutropha</i>	0,2	0,5	2	0	0,3	0,4	1	0	0,9	0,5	2	0
<i>N. europaea</i>	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0	0
<i>Nitrosococcus Mobilis</i>	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0	0
<i>Nitrolancetus hollandicus</i>	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0	0
<i>Nitrospira spp.</i>	0,1	0,3	1	0	0,1	0,3	1	0	1,7	1,1	5	1
<i>Nitrotoga sp.</i>	0,5	0,5	2	0	0,8	0,6	2	0	0,0	0,0	0	0
<i>Nitrobacter spp.</i>	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0	0	0,2	0,2	<1%	0
Subgrupo Thaumarchaeota	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0	0
<i>Nitrosopuymilus maritimus</i>	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0	0
Variables biológicas	EDAR QB				EDAR CX							
	M	DE	Mx	Mn	M	DE	Mx	Mn				
<i>Nitrosomonas spp.</i>	4,0	1,9	6	1	2,3	0,9	5	1				
<i>N. oligotropha</i>	2,8	1,4	5	1	1,0	0,7	2	0				
<i>N. halophila-eutropha</i>	0,0	0,0	0	0	1,0	0,7	2	0				
<i>N. europaea</i>	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0	0				
<i>Nitrosococcus Mobilis</i>	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0	0				
<i>Nitrolancetus hollandicus</i>	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0	0				
<i>Nitrospira spp.</i>	1,6	1,1	4	0	1,5	0,8	3	0				
<i>Nitrotoga sp.</i>	0,0	0,0	0	0	0,8	0,9	3	0				
<i>Nitrobacter spp.</i>	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0	0				
Subgrupo thaumarchaeota	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0	0				
<i>Nitrosopuymilus maritimus</i>	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0	0				

El género dominante responsable de la oxidación del nitrito, en ambos reactores de la EDAR CT, fue *Nitrotoga*. Este género presentó resultados positivos en un 87% de las muestras analizadas en CT1 y un 100% de las muestras de CT2. En ambos reactores su abundancia promedio fue del 1% y estuvo comprendida entre el 0% y 2%. El género *Nitrospira* presentó resultados positivos en un 30% de las muestras analizadas en CT1 y un 17% de las muestras de CT2. En ambos reactores su abundancia promedio fue menor del 1% y estuvo comprendida entre el 0% y 1%. Estos resultados dieron origen a un promedio del porcentaje total de BON del 1% en el reactor CT1 y del 2% en el reactor CT2.

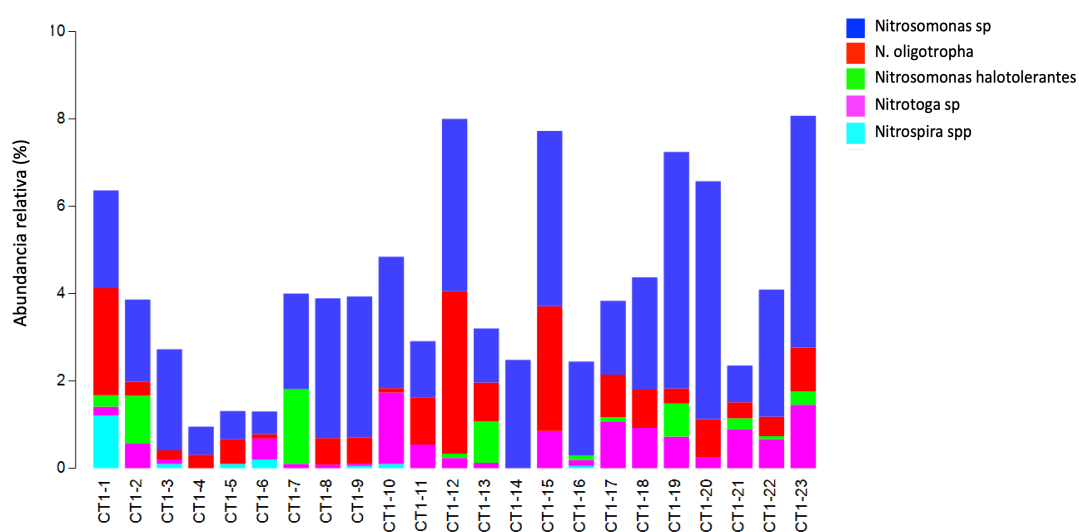


Figura 37. Abundancia relativa de las bacterias nitrificantes en el reactor CT1.

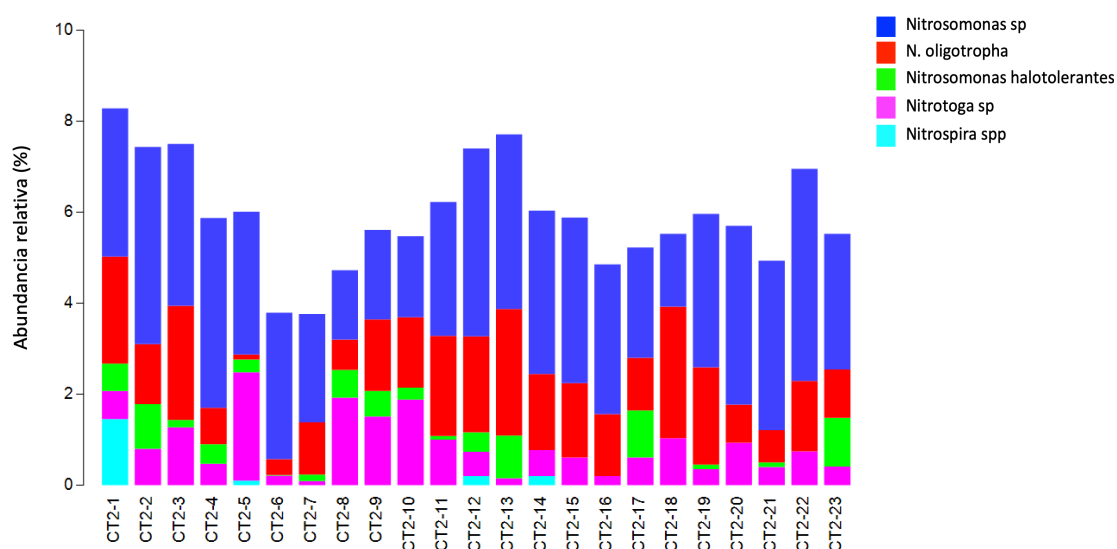


Figura 38. Abundancia relativa de las bacterias nitrificantes en el reactor CT2.

La concentración total de biomasa nitrificante estuvo comprendida en un rango del 1 al 6% en el reactor CT1 y del 2 al 6% en el reactor CT2, tomando valores promedio de 3% y 4% en cada uno de los reactores respectivamente.

En la Figura 39 se observa la dinámica poblacional de las BN en la EDAR CX. El género *Nitrosomonas* presentó resultados positivos en un 100% de las muestras analizadas. Su abundancia promedio fue del 2% y estuvo comprendida entre el 1% y 5%. *N. oligotropha* presentó resultados positivos en el 75% de las muestras analizadas. Su valor promedio fue del 1% y su abundancia estuvo comprendida entre 0 y 2%. El grupo de *Nitrosomonas* halotolerantes fue detectado en un 75% de las muestras. Su valor promedio fue del 1% y su abundancia estuvo comprendida entre 0 y 2%. El género dominante responsable de la oxidación del nitrito en la EDAR CX fue *Nitrospira*, el cual presentó resultados positivos en un 90% de las muestras analizadas. Su abundancia promedio fue del 2% y estuvo comprendida entre 0% y 3%. El género *Nitrotoga* presentó resultados positivos en un 60% de las muestras analizadas; su abundancia promedio fue del 1% y estuvo comprendida entre 0 y 3%. La concentración total de BON estuvo comprendida en un rango del 1 al 4%, siendo su valor promedio fue del 2%.

La concentración total de biomasa nitrificante estuvo comprendida en un rango del 2 al 7%, su valor promedio fue del 5%.

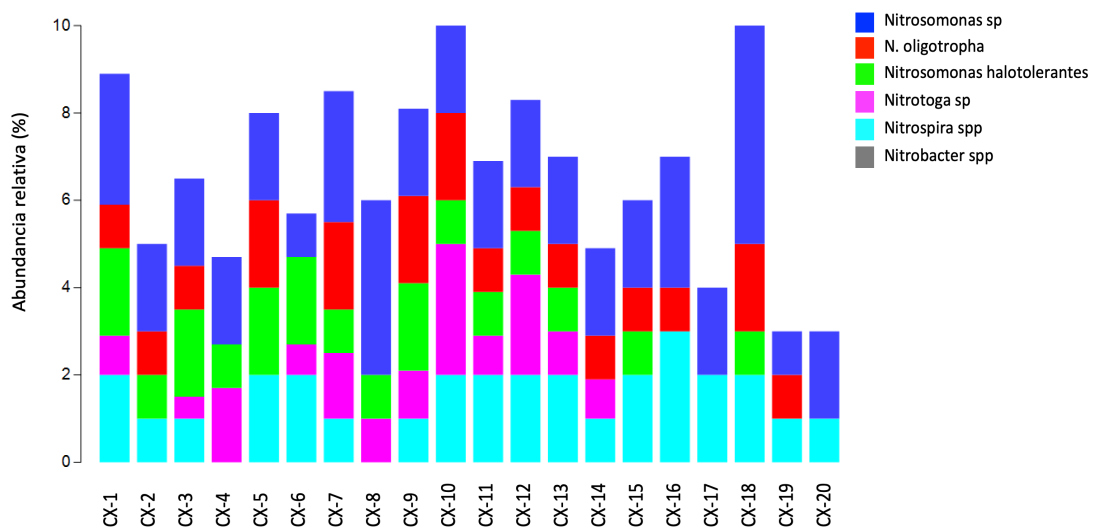


Figura 39. Abundancia relativa de las bacterias nitrificantes en el reactor CX.

En la Figura 40 se observa la dinámica poblacional de las BN en la EDAR DN. El género *Nitrosomonas* presentó resultados positivos en un 100% de las muestras analizadas. Su abundancia promedio fue del 3% y estuvo comprendida entre el 2 y 5%. *N. oligotropha* presentó resultados positivos en el 100% de las muestras analizadas. Su valor promedio fue del 1% y su abundancia estuvo comprendida entre el 0 y 3%. El grupo de *Nitrosomonas* halotolerantes fue detectado en un 100% de las muestras. Su valor promedio fue del 1% y su abundancia estuvo comprendida entre 0 y 2%. El género dominante responsable de la oxidación del nitrito fue *Nitrospira*, el cual presentó resultados positivos en un 100% de las muestras analizadas. Su abundancia promedio fue del 2% y estuvo comprendida entre el 1 y 5%. En la EDAR DN también se detectó la presencia del género *Nitrobacter* en un 31% de las muestras, aunque siempre en un porcentaje menor al 1%. Es por ello que para calcular el porcentaje de BON total en esta EDAR solo se ha considerado la abundancia determinada para el género *Nitrospira*.

La concentración total de biomasa nitrificante en la EDAR DN estuvo comprendida en un rango del 3 al 8%, y su valor promedio fue del 5%.

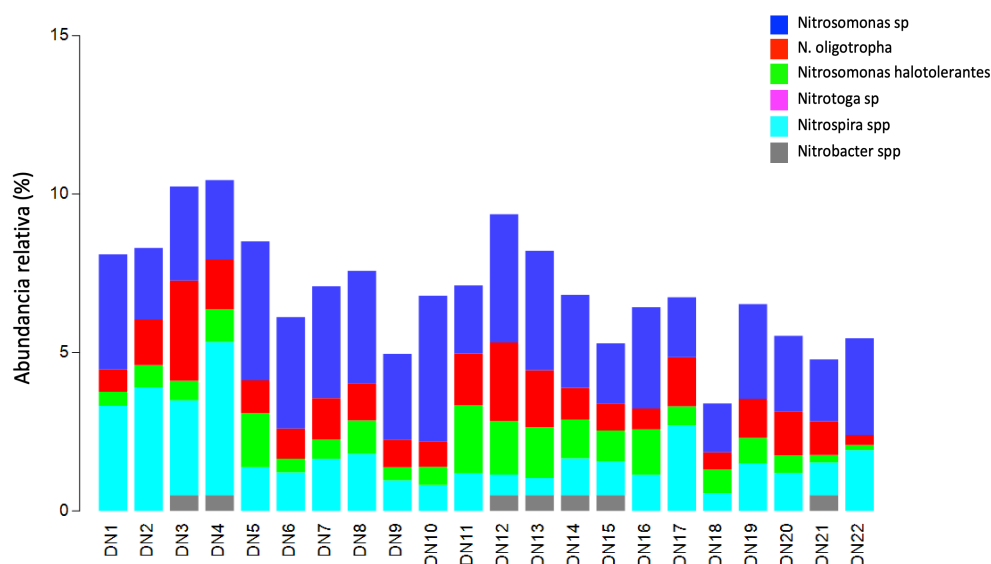


Figura 40. Abundancia relativa de las bacterias nitrificantes en el reactor DN.

En la Figura 41 se observa la dinámica poblacional de las BN en la EDAR QB. El género *Nitrosomonas* presentó resultados positivos en un 100% de las muestras analizadas. Su abundancia promedio fue del 4% y estuvo comprendida entre el 1 y 6%. *N. oligotropha*

presentó resultados positivos en el 100% de las muestras analizadas. Su valor promedio fue del 3% y su abundancia estuvo comprendida entre el 1 y 5%. El género dominante responsable de la oxidación del nitrato en la EDAR QB fue *Nitrosospira*, que presentó resultados positivos en un 99% de las muestras analizadas. Su abundancia promedio fue del 2% y estuvo comprendida entre 0 y 4%. Estos porcentajes se corresponden con el total de BON ya que fue el único género detectado.

La concentración total de biomasa nitrificante en la EDAR QB estuvo comprendida en un rango del 1 al 10%, su valor promedio fue del 6%.

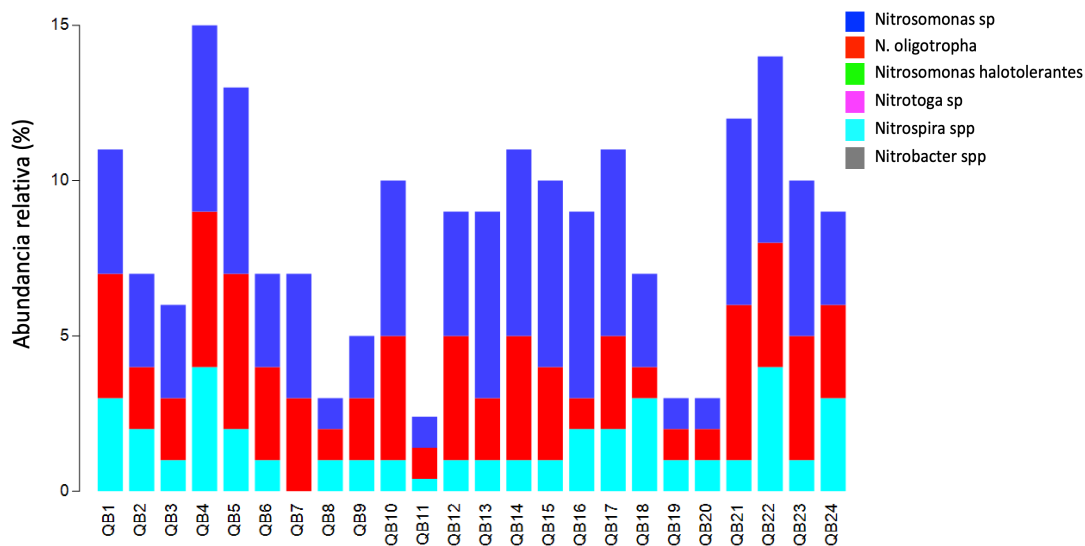


Figura 41. Abundancia de las bacterias nitrificantes en el reactor QB.

En la Figura 42 se representa la comparativa del promedio de las abundancias relativas detectadas en cada una de las EDAR analizadas en este apartado. En este gráfico se observa la distribución de los grupos taxonómicos entre los reactores y las diferencias en su composición biológica. Tal y como se ha comentado, el género *Nitrosomonas* resultó el género más abundante en todos los reactores estudiados. La EDAR QB mostró las mayores abundancias de BOA del género *Nitrosomonas* (4%) y de la especie *N. oligotropha* (3%), seguida por la EDAR CT2 (3% y 2% respectivamente). Las BON presentaron mayor abundancia en la EDAR CX, la cual destacó por la coexistencia de los géneros *Nitrosospira* y *Nitrotoga*. *Nitrosospira* presentó mayores abundancias en las EDAR QB y DN.

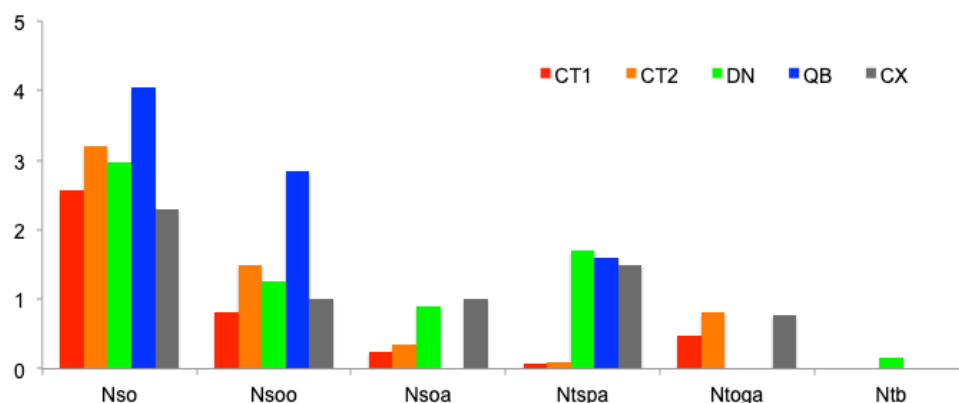


Figura 42. Promedio de la abundancia relativa de las poblaciones nitrificantes detectadas por FISH en los reactores CT1, CT2, DN, QB y CX.

Nso, *Nitrosomonas* spp.; Nsoo, *N. oligotropha*; Nsoa, *Nitrosomonas* halotolerantes; Ntspa, *Nitrospira* spp.; Ntoga, *Nitrotoga* sp.; Ntb, *Nitrobacter* spp.

Para analizar los datos obtenidos tras el análisis FISH se utilizó el software Primer v.6. (PRIMER-E, Plymouth, UK). Se aplicaron diversas técnicas estadísticas para explorar el conjunto de variables biológicas correspondientes a los géneros y especies de BOA y BON cuantificados.

El gráfico de trazado sombreado (Figura 43) muestra el análisis clúster entre las BN cruzado con el análisis clúster entre muestras, ambos generados a partir de las matrices de distancia. En el trazado sombreado se representa la composición de comunidad nitrificante; para ello emplea la abundancia relativa de los diferentes grupos taxonómicos expresada como raíz cuadrada, donde la gradación de color (blanco hasta negro) se corresponde con un valor creciente de la misma. En la parte superior de la figura de ordenación ambiental se muestra el análisis clúster de las muestras respecto al factor espacial. Este análisis aporta información sobre la similitud de las muestras entre los diferentes reactores. En este caso, se observa como la mayoría de las muestras de un mismo reactor aparecen agrupadas. Así mismo se observa una agrupación entre las muestras de los reactores CT1 y CT2, y las muestras de los reactores QB y DN. Las muestras más separadas en el dendograma fueron las de la EDAR CX, aunque mostraron cierta similitud con algunas de las muestras de CT1. Los factores biológicos también aparecieron asociados, observándose una agrupación entre la sonda del género *Nitrosomonas* y la especie *N. oligotropha* y ambas BOA cercanas al género *Nitrospira*. Por otro lado se agrupan las especies de *Nitrosomonas* halotolerantes y el género *Nitrotoga*.

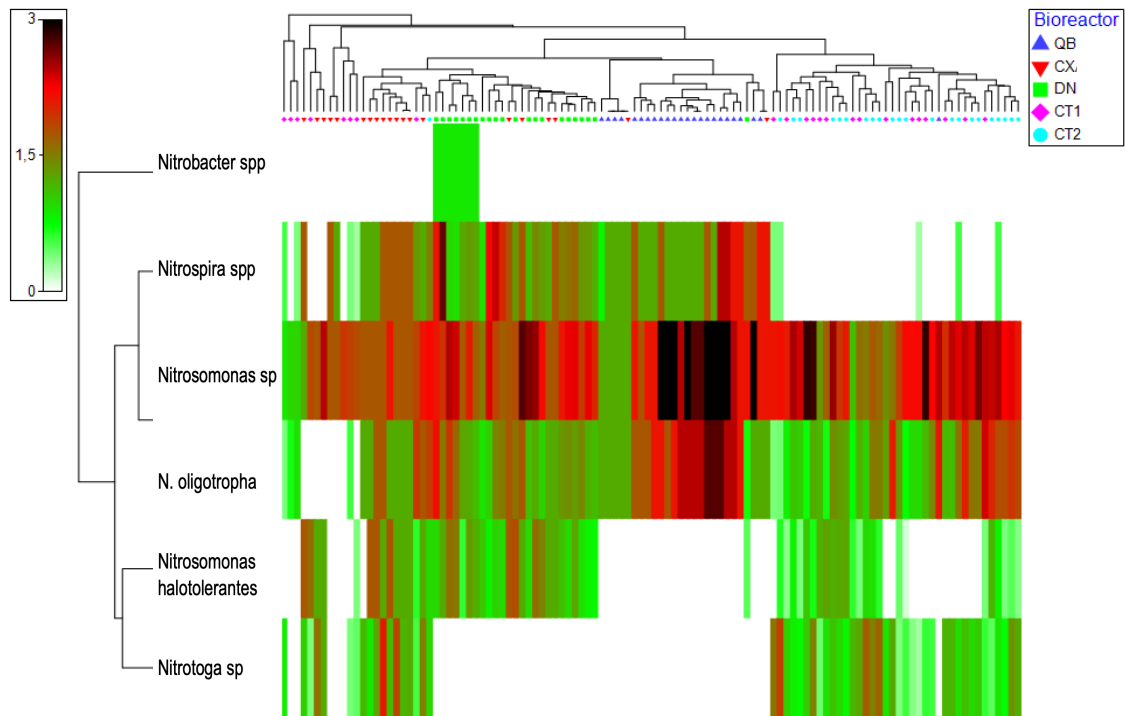


Figura 43. Raíz cuadrada de la abundancia relativa de las poblaciones nitrificantes detectadas por FISH en las EDAR DN, CT, QB y CX, representada a través del gráfico de trazado sombreado.

Para confirmar las diferencias espaciales observadas en el análisis clúster se realizó un análisis nMDS respecto al factor reactor y en función de la abundancia relativa de las variables biológicas (Figura 44). El análisis mostró un nivel de estrés dentro de los valores normales. El valor del nivel de estrés menor de 0,2 indica un buen ajuste para la representación de los datos a lo largo de los dos ejes de la figura de ordenación (Clarke y Warwick, 2001), lo que significa que las diferencias observadas respecto al factor reactor son significativas. Con el objetivo de obtener una representación más clara de las agrupaciones entre los reactores, se ha superpuesto el análisis clúster con un nivel de similitud de 75 según la distancia de Bray-Curtis. La figura del nMDS muestra tres grupos principales de distribución: un grupo compuesto por las muestras procedentes de CT1 y CT2, otro compuesto por las muestras de CX y DN y el formado principalmente por las muestras del reactor QB.



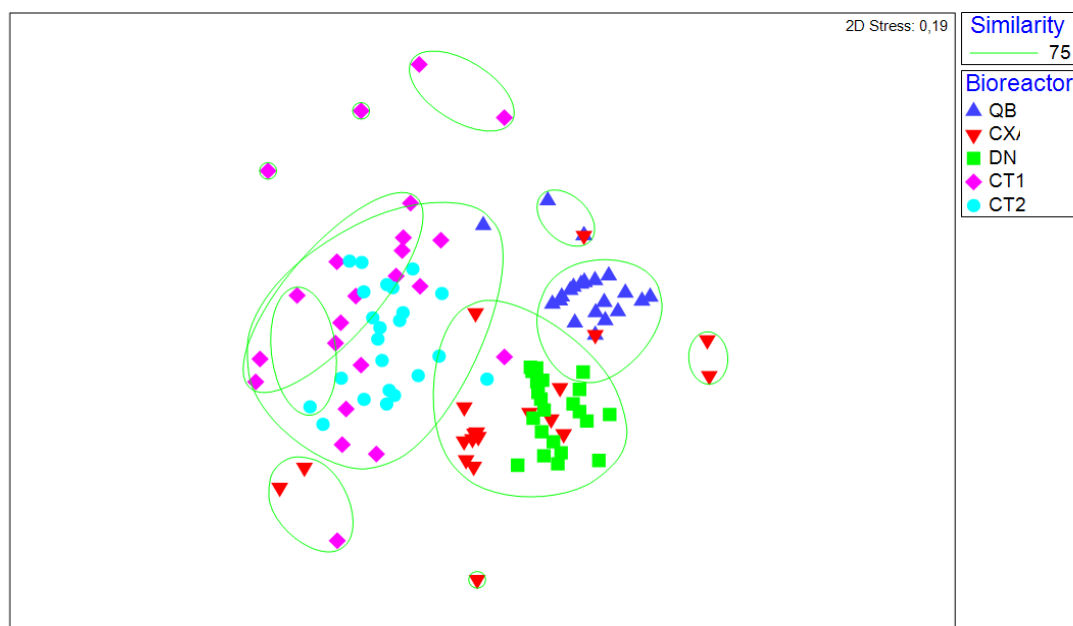


Figura 44. Análisis clúster sobre los resultados del nMDS aplicado a la abundancia relativa de bacterias nitrificantes según el factor espacial.

El análisis de similitud (ANOSIM) representado en la Tabla 8 muestra las diferencias entre los distintos reactores a partir de las abundancias relativas de las variables biológicas. Este análisis muestra que existen diferencias significativas entre los reactores, las cuales coinciden con el patrón encontrado en el nMDS (Figura 44). El valor 0,58 del estadístico global R indica que existe una separación entre reactores. Los estadísticos R parciales también indican resultados similares a los obtenidos con el nMDS, los cuales muestran una mayor separación entre CT2-DN ( $R=0,91$ ) y QB-CT2 ( $R=0,89$ ). Los reactores de la EDAR CT no muestran una separación significativa ( $R=0,13$ ), indicando que sus respectivas comunidades biológicas fueron similares a lo largo del tiempo, aspecto esperado puesto que se trata de reactores que operan en paralelo.

Tabla 8. ANOSIM a partir de las abundancias relativas de las variables biológicas según el factor reactor en las EDAR CT, CX, DN y QB

Estadístico global R		0,58
Reactor	R	Significancia (%)
QB, CX	0,58	0,1
QB, DN	0,70	0,1
QB, CT1	0,70	0,1
QB, CT2	0,89	0,1
CX, DN	0,33	0,1
CX, CT1	0,44	0,1
CX, CT2	0,61	0,1
DN, CT1	0,69	0,1
DN, CT2	0,91	0,1
CT1, CT2	0,13	0,1

Con el objetivo de determinar patrones temporales se realizó un análisis nMDS respecto al factor estacional y en función de la abundancia relativa de las variables biológicas (Figura 45). Este análisis no mostró patrones significativos de distribución. Este resultado fue contrastado con un análisis de similitud ANOSIM, el cual dio como resultado un valor del estadístico R de 0,009, confirmando que no existen diferencias significativas respecto al factor estacional. Esto significa que la variación de las poblaciones a lo largo del tiempo no estuvo condicionadas por los factores ambientales asociados a los cambios de estación durante el año.

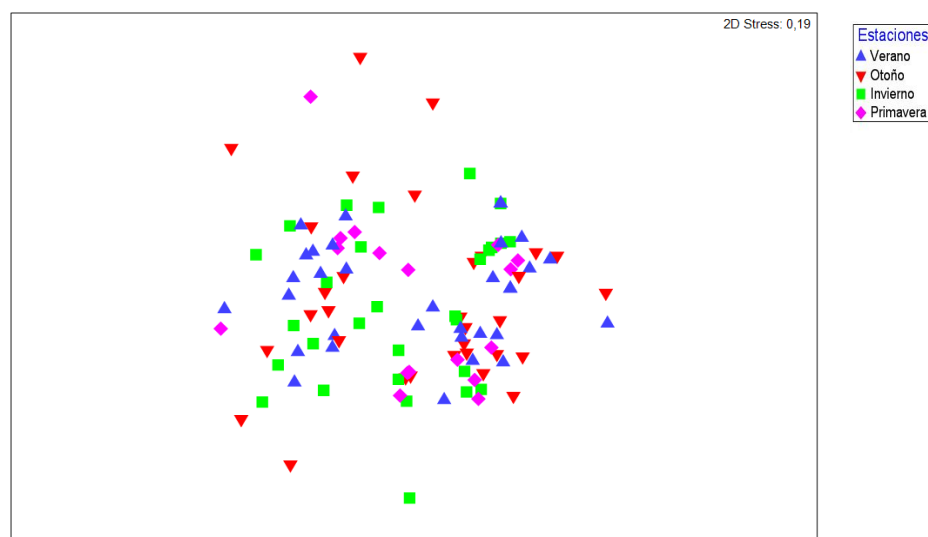


Figura 45. Análisis nMDS sobre los datos la abundancia relativa de bacterias nitrificantes según el factor estacional.

### *Interpretación ambiental de la dinámica poblacional de las bacterias nitrificantes*

Con el objetivo de encontrar posibles relaciones entre las variables ambientales y la comunidad de BN, se llevó a cabo un análisis de regresión multivariante, con la finalidad de obtener modelos de interpretación ambiental.

Los modelos lineales multivariantes se han explorado por separado en cada uno de los reactores a excepción de los reactores CT1 y CT2. Estos reactores se han explorado conjuntamente por tratarse de líneas paralelas con el mismo proceso de depuración, pero variables de operación y afluentes diferentes. Esta decisión además fue motivada por los resultados de los análisis de similitud ANOSIM y nMDS según el factor reactor, los cuales no mostraron diferencias significativas entre las comunidades de BN entre ambos reactores. La construcción de los modelos se ha basado en el uso de los criterios y procedimientos más parsimoniosos: *step-wise/AICc*, a excepción del modelo realizado para el reactor CX, donde se optó por el uso de otros criterios (*forward/adjusted R<sup>2</sup>*) para incluir más de una variable biológica en los modelos.

Los DISTLM utilizados para evaluar las correlaciones entre la población de bacterias nitrificantes y las variables ambientales en los reactores de las EDAR CT y QB (Tabla 9 a y d ), no presentaron una buena capacidad explicativa. Esto se deduce de los elevados valores de  $p$  ( $p > 0,05$ ), junto con los bajos valores de *pseudo-F*, los cuales indican una probabilidad mayor de que la hipótesis verdadera sea nula.

El DISTLM empleado para evaluar las correlaciones entre la población de bacterias nitrificantes y las variables ambientales en el reactor DN (Tabla 9 b) mostró que el 54,48% de la variación de las comunidades de bacterias nitrificantes puede explicarse a partir de la concentración de oxígeno en el reactor, la carga másica (CM) y el ratio DQO/DBO<sub>5</sub>.

Tabla 9. Resultados del test secuencial para el análisis DISTLM realizado entre las variables ambientales y bacterias nitrificantes en las EDAR CT, CX, DN y QB.

a) EDAR CT				
Variable	AICc	Pseudo-F	p	% Prop.
%DQOs	284	2,18	0,063	4,70
ODm	283	2,98	0,017	6,20
Variación total explicada				10,90
b) EDAR DN				
Variable	AICc	Pseudo-F	p	% Prop.
ODm	108	4,87	0,002	19,59
CM	106	4,51	0,011	15,43
ODa	105	3,89	0,011	11,54
DQO/DBO <sub>5</sub>	105	2,95	0,028	7,91
Variación total explicada				54,48
c) EDAR QB				
Variable	AICc	Pseudo-F	p	% Prop.
%DQOs	118	13,71	0,001	38,38
ODa	117	3,39	0,055	8,56
T <sup>a</sup> r	116	3,26	0,056	7,43
CN-NH <sub>4</sub>	116	2,88	0,08	6,00
Variación total explicada				60,37
d) EDAR CX				
Variable	Ajuste R <sup>2</sup>	Pseudo-F	p	% Prop.
SSLM	0,11	3,29	0,057	15,47
T <sup>a</sup> r	0,12	1,17	0,355	5,43
ODm	0,13	1,19	0,32	5,48
Variación total explicada				26,38

%DQOs, porcentaje de DQO soluble afluente al reactor biológico; ODm, porcentaje de tiempo en el que el oxígeno se mantuvo entre 0,8 y 2 mg/L en el reactor biológico; CM, carga másica; ODa, porcentaje de tiempo en el que el oxígeno se mantuvo por encima 2 mg/L en el reactor biológico; T<sup>a</sup>r, temperatura en el reactor biológico; CN-NH<sub>4</sub>, concentración de nitrógeno amoniacal en el afluente al reactor biológico; SSLM, sólidos suspendidos del licor mezcla.

El test secuencial indicó que la concentración media de oxígeno (ODm) en el reactor fue la variable que mayor porcentaje de variación explica (19,59%). Los coeficientes de correlación de Pearson de las abundancias de las distintas especies de BOA y BON con cada uno de los ejes del dbRDA han sido calculados para identificar su respuesta ante las diferentes variables ambientales. El ODm se relacionó inversamente con el eje 2 del dbRDA, el cual explica un 18,97% de la variación (Tabla 10). Los coeficientes de correlación múltiple parcial en el modelo relacionan el género *Nitrospira* con este eje ( $r = -0,78$ ). El eje 1 del dbRDA explica el 30,99 de la variación; ODa ( $r=0,55$ ) y la CM ( $r=-0,58$ )

fueron las variables más correlacionadas con este eje, explicando cada una de ellas un 15,43% y un 11,54% del total de la variación, respectivamente.

Tabla 10. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables ambientales y correlaciones de las variables biológicas con los ejes del dbRDA en la EDAR DN

EDAR DN	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3	dbRDA4
% variación explicada	30,99	18,97	5,20	-0,68
Variable	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3	dbRDA4
ODm	0,44	-0,84	0,18	-0,27
CM	0,55	0,44	-0,27	-0,65
ODa	-0,58	0,01	0,46	-0,68
DQO/DBO <sub>5</sub>	0,40	0,33	0,83	0,22
Nso	0,14	0,15	-0,48	0,11
Nsoo	0,73	-0,13	-0,18	0,06
Nsoe	0,45	0,22	-0,05	-0,10
Ntoga	0,00	0,00	0,00	0,00
Ntspa	0,29	-0,78	0,09	0,08
Ntb	0,63	0,21	0,15	-0,10

ODm, porcentaje de tiempo en el que el oxígeno se mantuvo entre 0,8 y 2 mg/L en el reactor biológico; CM, carga másica; ODa, porcentaje de tiempo en el que el oxígeno se mantuvo por encima 2 mg/L en el reactor biológico; Nso, *Nitrosomonas* spp.; Nsoo, *Nitrosomonas oligotropha*; Nsoe, *Nitrosomonas* halotolerantes; Ntoga, *Nitrotoga* sp.; Ntspa, *Nitrospira*, spp.; Ntb, *Nitrobacter* spp.

En el diagrama de burbujas de la variable ODm representado en la Figura 46 se puede observar como los mayores valores de abundancia relativa de *Nitrospira* ocurrieron cuando el OD del reactor se mantuvo entre de 0,8 y 2 mgO<sub>2</sub>/L más del 33% del tiempo.

En la Figura 47 se observa como la abundancia de *N. oligotropha* y *Nitrobacter* en la EDAR DN se asoció a valores de CM superiores a 0,15 KgDBO<sub>5</sub>/KgSSVLM ·d. Aunque el ODa también fue seleccionada como variable significativa, no se ha incluido en lo dbRDA debido a que varió entre un rango del 0-9% es decir que únicamente el 9% del tiempo permaneció el OD por encima de 2 mg/L en el medio.

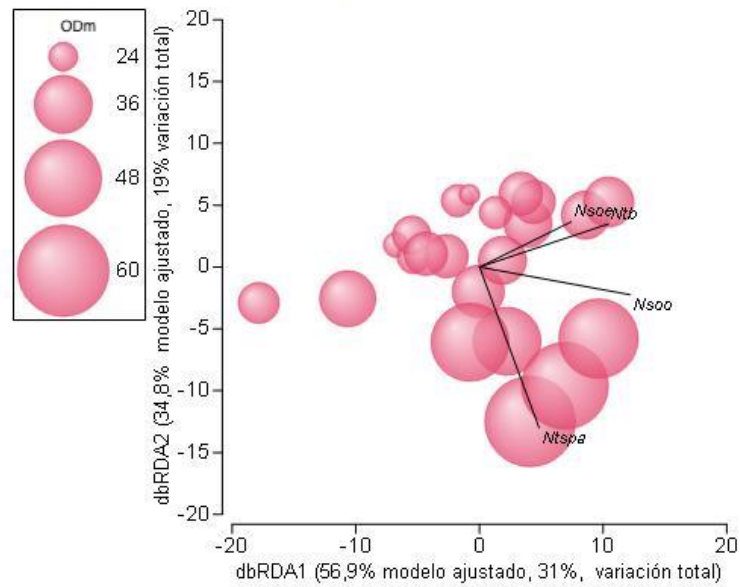


Figura 46. Gráfico de burbujas del porcentaje de tiempo en que el oxígeno se mantuvo en concentraciones entre 0,8 y 2mg/L (ODm) en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las variables ambientales y biológicas en la EDAR DN.

Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson de las variables biológicas mayores de 0,40 y -0,40. Nsoo, *Nitrosomonas oligotropha*; Nsoe, *Nitrosomonas halotolerantes*; Ntspa, *Nitrospira spp*; Ntb, *Nitrobacter spp*.

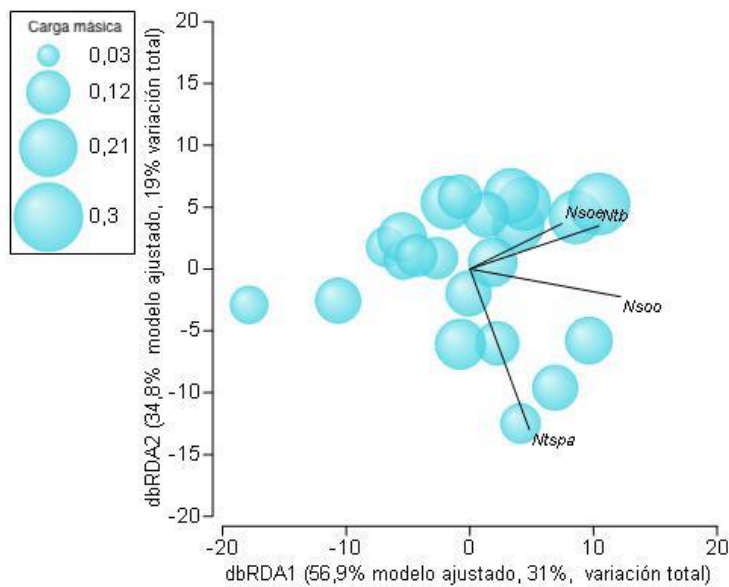


Figura 47. Gráfico de burbujas de la carga másica en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las variables ambientales y biológicas en la EDAR DN.

Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson de las variables biológicas mayores de 0,40 y -0,40. Nsoo, *Nitrosomonas oligotropha*; Nsoe, *Nitrosomonas halotolerantes*; Ntspa, *Nitrospira spp.*; Ntb, *Nitrobacter spp*.

Los resultados del test secuencial del modelo lineal multivariante obtenido para el reactor QB indican que el porcentaje de DQO soluble en el afluente al reactor (%DQOs) explicó un 38,38 % de la variación de las comunidades de bacterias nitrificantes. El eje 1 del dbRDA, el cual explica el 52,51%, apareció relacionado negativamente con esta variable ( $r=-0,86$ ) y positivamente con el género *Nitrosomonas* ( $r=0,74$ ) y la especie *N. oligotropha* ( $r=0,68$ ) (Tabla 11).

Tabla 11. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables ambientales y correlaciones de las variables biológicas con los ejes del dbRDA en la EDAR QB.

EDAR QB	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3	dbRDA4
% variación explicada	52,51	4,44	3,52	-0,09
Variable	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3	dbRDA4
%DQOs	-0,86	-0,31	-0,31	-0,27
ODa	-0,42	0,21	0,18	0,87
T <sup>r</sup>	-0,26	0,12	0,90	-0,34
CN-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,16	-0,92	0,27	0,25
Nso	0,74	-0,05	0,27	0,00
Nsoo	0,68	0,00	-0,24	0,03
Ntspa	0,41	0,37	-0,07	-0,02

%DQOs, porcentaje de DQO soluble afluente al reactor biológico; ODa, porcentaje de tiempo en el que el oxígeno se mantuvo por encima 2 mg/L en el reactor biológico; T<sup>r</sup>, temperatura en el reactor biológico; CN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, concentración de nitrógeno amoniacal en el afluente al reactor biológico; Nso, *Nitrosomonas* spp.; Nsoo, *Nitrosomonas oligotropha*; Ntspa, *Nitrospira* spp..

En el diagrama de burbujas del dbRDA de la Figura 48 se ilustran los coeficientes de correlación de Pearson de las distintas especies calculados para identificar su respuesta debido a la variación del %DQOs. En la figura se observa como las abundancias del género *Nitrosomonas*, *N. oligotropha* y el género *Nitrospira* (aunque no de manera significativa) se relacionan con %DQOs menores del 50%.

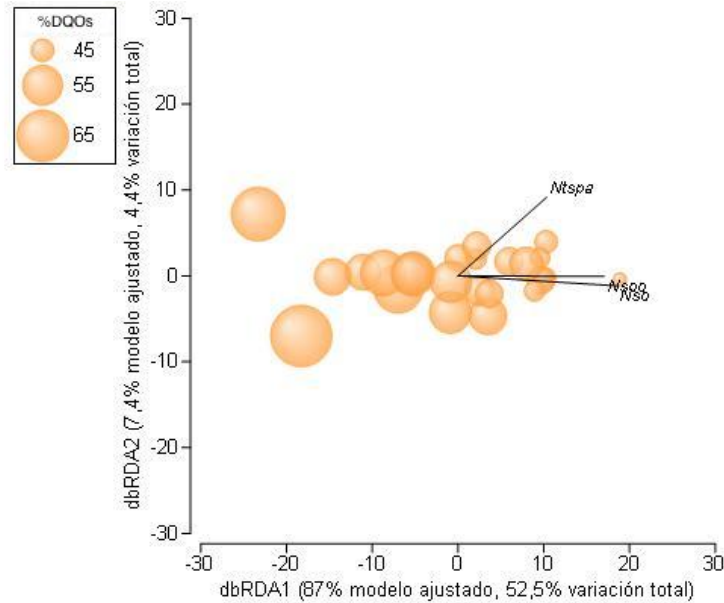


Figura 48. Gráfico de burbujas del %DQOs en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las variables ambientales y biológicas en la EDAR QB.

Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson de las variables biológicas mayores de 0,40 y -0,40. Nso, *Nitrosomonas* spp.; Nsoo, *Nitrosomonas oligotropha*; Ntspa, *Nitrospira* spp.

#### 4.1.2 Análisis de los rendimientos de eliminación de las fracciones del nitrógeno en las EDAR CT, CX, DN y QB

*Evolución temporal y espacial de los rendimientos del nitrógeno en cada una de las EDAR CT, CX, DN y QB.*

En el siguiente apartado se han aplicado diferentes técnicas estadísticas para explorar el conjunto de variables relativas a las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación. Para realizar este análisis se han seleccionado 8 variables relacionadas con las concentraciones de las diferentes fracciones del nitrógeno en el efluente (NT, NTs, NKT, NKTs, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, %N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y 5 variables relacionadas con los rendimientos del proceso de depuración (rNT, rNTs, rNKT, rNKTs y rN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>).

En la Tabla 12 se muestran los resultados de la media, desviación estándar y rango de las distintas fracciones del nitrógeno y sus rendimientos de eliminación en cada uno de los reactores analizados en este apartado.



Tabla 12. Rango, media y desviación estándar de las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus respectivos rendimientos de eliminación.

	Unidades	Reactor CX				Reactor DN				Reactor QB			
		Mínimo	Máximo	Media	DE	Mínimo	Máximo	Media	DE	Mínimo	Máximo	Media	DE
NTs	mgN/L	8,90	38,90	22,10	7,70	3,30	9,40	6,40	1,60	5,60	45,00	19,00	11,50
rNTs	%	21,47	67,23	50,05	13,43	69,05	91,44	82,79	5,53	28,22	83,03	59,79	14,64
N-NH <sub>4</sub>	mgN/L	0,06	19,00	4,54	6,72	0,03	1,22	0,17	0,27	0,10	32,60	9,55	9,74
rN-NH <sub>4</sub>	%	18,52	99,61	83,70	23,95	89,39	99,90	99,02	2,24	41,88	99,60	78,88	18,61
N-NO <sub>2</sub>	mgN/L	0,02	1,83	0,67	0,52	0,00	0,32	0,05	0,07	0,04	5,67	1,35	1,50
N-NO <sub>3</sub>	mgN/L	6,53	18,50	11,91	3,48	1,71	7,15	3,91	1,74	0,36	11,10	6,14	2,67
NKTs	mgN/L	1,44	29,86	9,55	8,29	0,45	4,78	2,45	1,06	0,98	35,95	11,45	10,54
rNKTs	%	20,68	87,79	62,10	20,26	82,96	99,12	93,29	3,50	44,69	96,39	77,47	16,91
%N-NO <sub>2</sub>	%	0,16	13,74	5,50	4,15	0,05	5,21	1,24	1,40	1,07	50,31	16,40	12,78

	Unidades	Reactor CT1				Reactor CT2			
		Mínimo	Máximo	Media	DE	Mínimo	Máximo	Media	DE
NTs	mgN/L	17,00	53,01	33,10	11,02	20,01	48,00	32,00	7,70
rNTs	%	4,00	60,47	36,03	13,95	20,00	57,14	36,52	10,02
N-NH <sub>4</sub>	mgN/L	4,40	45,00	26,50	11,84	15,00	42,00	26,83	7,98
rN-NH <sub>4</sub>	%	10,20	89,52	44,20	20,68	14,58	63,16	41,05	11,77
N-NO <sub>2</sub>	mgN/L	0,00	5,20	2,03	1,69	0,00	3,20	1,31	0,88
N-NO <sub>3</sub>	mgN/L	0,50	4,70	1,45	1,25	0,50	3,60	1,66	1,03
NKTs	mgN/L	12,10	52,31	29,65	12,60	16,00	46,10	28,99	8,49
rNKTs	%	5,26	71,40	43,41	17,88	22,91	61,69	42,93	10,73
%N-NO <sub>2</sub>	%	0,60	91,07	52,21	23,79	0,50	6,80	2,97	1,72

NTs, nitrógeno total soluble; rNTs, rendimiento de eliminación del nitrógeno total soluble; N-NH<sub>4</sub>, concentración de amonio; rN-NH<sub>4</sub>, rendimiento de eliminación del amonio; N-NO<sub>2</sub>, concentración de nitrito; N-NO<sub>3</sub>, concentración de nitrato; NKT, nitrógeno Kjeldahl; NKTs, nitrógeno Kjeldahl soluble; %N-NO<sub>2</sub>, porcentaje de nitrito respecto al nitrógeno total en el efluente. DE, desviación estándar.

En la Figura 49 se puede observar la situación global de cada una de las EDAR estudiadas en este apartado respecto al proceso de nitrificación-desnitrificación. Los reactores CT1 y CT2 muestran una nitrificación escasa, caracterizada por una concentración elevada de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en el efluente (media 26,50±11,84 y 26,85±7,89 mgN/L, respectivamente). En el reactor CT1 de esta EDAR se observaron las mayores concentraciones de nitrito en el efluente. De forma contraria, DN muestra una excelente capacidad de nitrificación-desnitrificación. En la EDAR CX se observa una nitrificación moderada y una desnitrificación incompleta, como se deduce por la elevada concentración de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el efluente (media 11,91±3,48 mgN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L). En el reactor QB se observan dos situaciones, periodos con una excelente nitrificación-desnitrificación y periodos con

escasa nitrificación, la cual se deduce de la elevada desviación estándar del  $\text{N-NH}_4^+$  del efluente (media  $9,55 \pm 9,74$  mgN- $\text{NH}_4^+$ /L).

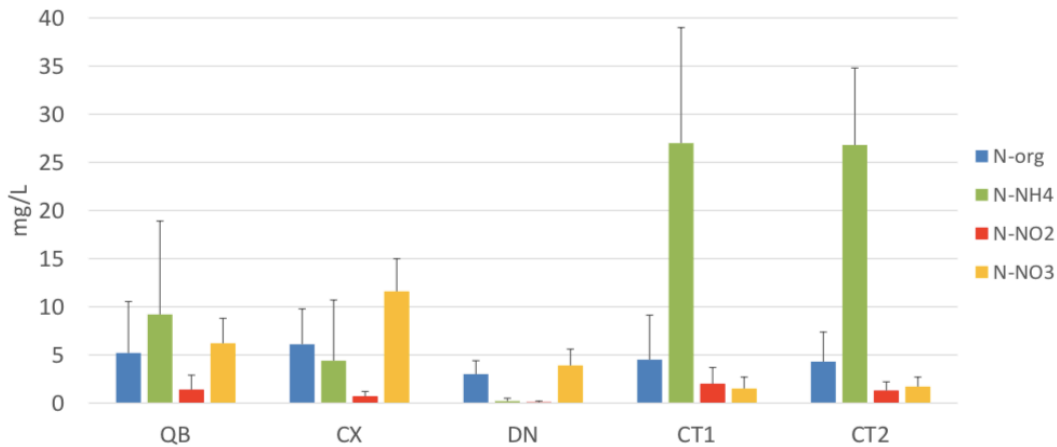


Figura 49. Valores promedio y desviación estándar de las fracciones del nitrógeno del efluente en los reactores QB, CX, DN, CT1 y CT2.

N-NH<sub>4</sub>, concentración de amonio; N-NO<sub>2</sub>, concentración de nitrito; N-NO<sub>3</sub>, concentración de nitrato; N-org, nitrógeno orgánico.

El rNKTs de los distintos reactores, representado en el diagrama de cajas y bigotes de la Figura 50, está en concordancia con los resultados anteriores. Los mayores rendimientos de eliminación se observaron en el reactor DN (media  $99,02 \pm 2,24$  mgN- $\text{NH}_4^+$ /L), seguidos por los reactores QB, CX y CT. La EDAR DN se caracterizó, principalmente, por el estrecho margen de variación de sus elevados rendimientos de eliminación. Los reactores QB, CX y CT1, sin embargo, presentaron una elevada variación, tal y como indica el mayor rango de longitud intercuartílico. La distancia entre bigotes, en los tres casos, refleja elevados y bajos valores de rNKTs, especialmente en el reactor CT1, donde aparecieron los menores rendimientos. En CX, la posición de la mediana en la parte superior del rango intercuartílico indica que el 25% de los valores de dicho rango se agruparon en un estrecho intervalo (67-75%). En el caso de CT2 la mediana está desplazada a la parte inferior del rango intercuartílico, lo cual indica que la mayor parte de los valores se agruparon por debajo de ese valor.

La prueba de Kolmogorov-Smirnov indicó 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*), indicó, en general, una falta de simetría en los datos referidos a los componentes del nitrógeno.

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

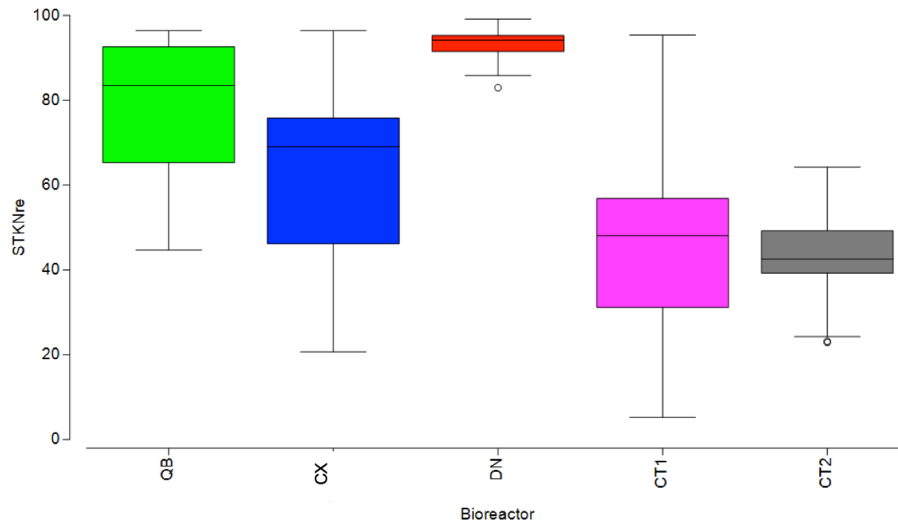


Figura 50. Diagrama de cajas y bigotes del rendimiento de eliminación del NKT soluble (sNKTre) expresado en porcentaje, en los reactores CT1, CT2, CX, DN y QB.

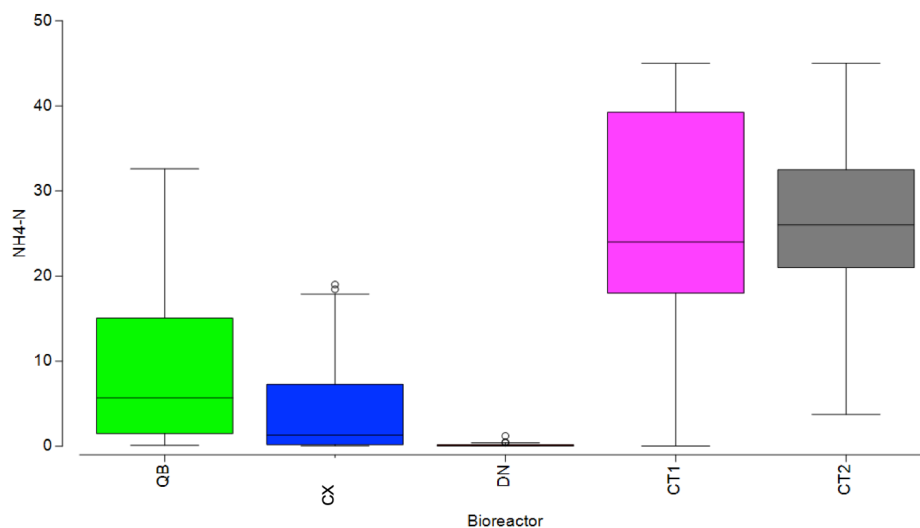


Figura 51. Diagrama de cajas y bigotes del nitrógeno amoniacal del efluente en mg/L ( $\text{N-NH}_4$ ) en los reactores QB, CX, DN, CT1 y CT2.

Los resultados del nMDS y análisis clúster, según el factor reactor y a partir de los componentes del nitrógeno diferenciaron tres grandes grupos de muestras a partir del valor 3,8 de la distancia euclídea (Figura 52). El primero se encuentra formado por todas las muestras de DN y parte de las correspondientes a CX y QB. El segundo se encuentra formado por la mayoría de muestras de CT1 y CT2, y parte de las correspondientes a CX y QB. El tercero, más pequeño que el resto, se encuentra representado por algunas muestras de CT1 y CT2.

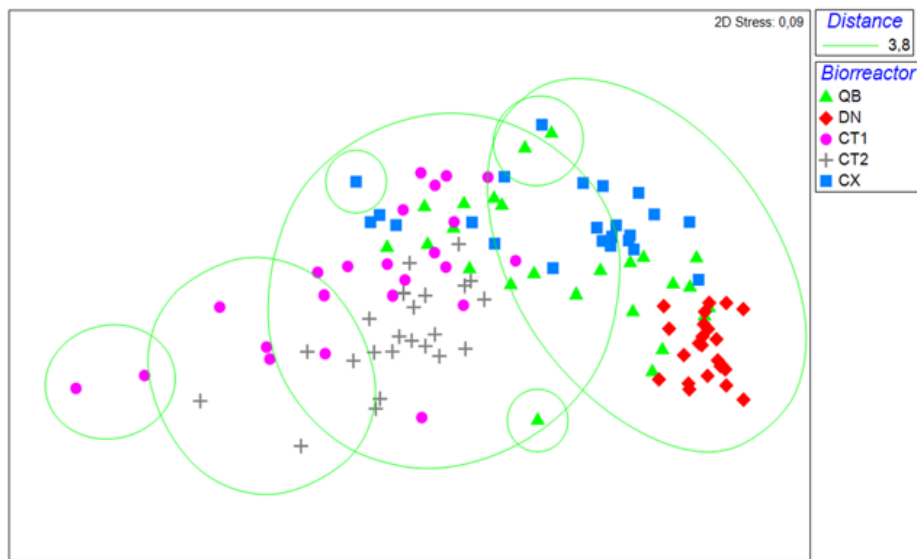


Figura 52. nMDS a partir de los componentes del nitrógeno del efluente según el factor espacial.

Los resultados de la rutina ANOSIM (Tabla 13) coincidieron con el patrón espacial observado en el nMDS, indicando que existe una separación entre reactores ( $R=0,71$  y  $p=0,001$ ) a partir de las fracciones del nitrógeno en el efluente. La mayor distancia observada corresponde a DN y los reactores CT1, CT2 y CX, mientras que la menor separación la muestran CX y QB.

Por otro lado, los resultados de la rutina ANOSIM respecto al factor estacional ( $R_{\text{global}}=-0,007$  y  $p=0,001$ ) indica que los componentes del nitrógeno del efluente no muestran diferencias significativas debidas al factor estacional, no presentando además el nMDS ningún patrón definido de distribución estacional.

Tabla 13. ANOSIM a partir de las abundancias relativas de las variables biológicas según el factor reactor

Estadístico global R		0,71
Reactor	R	p
QB, CX	0,30	0,001
QB, DN	0,59	0,001
QB, CT1	0,53	0,001
QB, CT2	0,57	0,001
CX, DN	0,92	0,001
CX, CT1	0,85	0,001
CX, CT2	0,81	0,001
DN, CT1	0,99	0,001
DN, CT2	0,99	0,001
CT1, CT2	0,42	0,001

*Análisis de la contribución de la población de bacterias nitrificantes a la eliminación de amonio en la EDAR.*

El objetivo de este apartado fue la construcción de modelos de interpretación ambiental que permitan explicar la contribución de las distintas BOA y BON a la eliminación del amonio.

Los modelos lineales multivariantes se han explorado por separado en cada uno de los reactores, a excepción de los reactores CT1 y CT2, los cuales se han explorado conjuntamente por tratarse de líneas paralelas con el mismo proceso de depuración. Esta decisión fue además motivada por los resultados de los análisis de similitud ANOSIM y nMDS según el factor reactor, los cuales no mostraron diferencias significativas entre los rendimientos de eliminación del nitrógeno de ambos reactores. Los modelos de las EDAR CT y QB se han basado en el uso de los criterios y procedimientos más parsimoniosos: *step-wise* y *AICc*. En las EDAR CX y DN se utilizaron los procedimientos *forwar* y *adjusted R<sup>2</sup>* para incluir más de una variable biológica en los modelos.

En la Tabla 14 se presentan los resultados del test secuencial de los modelos lineales multivariantes utilizados para evaluar las correlaciones entre la población de bacterias nitrificantes y las fracciones del nitrógeno en los diferentes reactores.

El DISTLM construido para los dos reactores de la EDAR CT (Tabla 14 a) indicó que, el 20,79% de la variación de las comunidades de bacterias nitrificantes se relacionó con el rNTs (13,37% de la variación total) y el %N-NO<sub>2</sub> (7,43% de la variación total).

Los resultados del modelo fueron visualizados usando un dbRDA (Figura 53). Con el objetivo de detectar qué variables mostraron las mejores correlaciones con el conjunto de variables relacionadas con los rendimientos de eliminación del nitrógeno y las diferentes fracciones del nitrógeno en el efluente, los coeficientes de correlación de Pearson fueron añadidos como vectores. El 18,9% de la variación fue explicado por el eje de ordenación 1.

Tabla 14. Resultados del test secuencial para el análisis DISTLM realizado entre la concentración en el efluente del decantador secundario de las diferentes fracciones del nitrógeno y sus rendimientos de eliminación y las bacterias nitrificantes en las EDAR CT, CX, DN y QB.

a) EDAR CT				
Variable	AICc	Pseudo-F	p	% Prop.
rNTs	279	6,78	0,002	13,37
%N-NO <sub>2</sub>	278	4,03	0,002	7,43
Variación total explicada				20,79
b) EDAR DN				
Variable	Adj R <sup>2</sup>	Pseudo-F	p	% Prop.
N-NO <sub>3</sub>	0,07	2,71	0,039	11,96
N-NH <sub>4</sub>	0,10	1,60	0,203	6,85
rNTs	0,11	1,17	0,342	4,99
rNKTs	0,12	1,09	0,362	4,61
N-NO <sub>2</sub>	0,12	1,00	0,454	4,23
Variación total explicada				32,63
c) EDAR QB				
Variable	AICc	Pseudo-F	p	% Prop.
rNKTs	115	19,26	0,001	46,69
NTs	112	5,17	0,007	10,54
Variación total explicada				57,23
d) EDAR CX				
Variable	Ajuste R <sup>2</sup>	Pseudo-F	p	% Prop.
%N-NO <sub>2</sub>	0,08	2,56	0,0970	12,44
N-NO <sub>2</sub>	0,14	2,25	0,1120	10,23
N-NO <sub>3</sub>	0,14	1,09	0,3710	4,95
rNKTs	0,20	2,16	0,1420	9,13
N-NH <sub>4</sub>	0,26	2,15	0,1400	8,42
rN-NH <sub>4</sub>	0,29	1,62	0,2140	6,09
NKTs	0,40	3,44	0,0550	10,87
NTs	0,41	1,20	0,3420	3,73
Variación total explicada				65,86

NTs, nitrógeno total soluble; rNTs, rendimiento de eliminación del nitrógeno total soluble; N-NH<sub>4</sub>, concentración de amonio; rN-NH<sub>4</sub>, rendimiento de eliminación del amonio; N-NO<sub>2</sub>, concentración de nitrito; N-NO<sub>3</sub>, concentración de nitrato; NKTs, nitrógeno Kjeldahl soluble; rNKTs, rendimiento de eliminación del nitrógeno Kjeldahl soluble; %N-NO<sub>2</sub>, porcentaje de nitrito respecto al nitrógeno total en el efluente.

Las variables biológicas con los mayores coeficientes de correlación con este eje fueron el género *Nitrosomonas*, la especie *N. oligotropha* y el género *Nitrotoga* ( $r = -0,47$ ,  $r = -0,45$  y  $r = -0,46$  respectivamente). El dbRDA muestra como la abundancia de estas variables biológicas se relaciona positivamente con valores del rNTs mayores del 50%. El %N-NO<sub>2</sub> del efluente presenta una correlación positiva elevada con el eje 1 del dbRDA ( $r=0,57$ ) y con el eje 2 ( $r=0,82$ ). Aunque la correlación es mayor en el segundo eje de ordenación ninguna de las variables biológicas ha presentado coeficientes de correlación significativos con este eje. Las relaciones observadas con el eje de ordenación indican que el %N-NO<sub>2</sub> del efluente se relaciona de manera inversa con la abundancia de *Nitrosomonas*, la especie *N. oligotropha* y el género *Nitrotoga*.

Tabla 15. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación y correlaciones de las variables biológicas con los ejes del dbRDA en la EDAR CT

EDAR CT	dbRDA1	dbRDA2
% variación explicada	18,94	1,86
Variable	dbRDA1	dbRDA2
rNTs	-0,82	0,57
%NO <sub>2</sub> -N	0,57	0,82
Nso	-0,47	0,12
Nsoo	-0,45	-0,15
Nsoe	-0,27	-0,08
Ntoga	-0,46	-0,12
Ntspa	0,02	0,04

rNTs, rendimiento de eliminación del nitrógeno total soluble; %N-NO<sub>2</sub>, porcentaje de nitrito respecto al nitrógeno total en el efluente. Nso, *Nitrosomonas* spp.; Nsoo, *Nitrosomonas oligotropha*; Nsoe, *Nitrosomonas* halotolerantes; Ntoga, *Nitrotoga* sp.; Ntspa, *Nitrospira* spp.

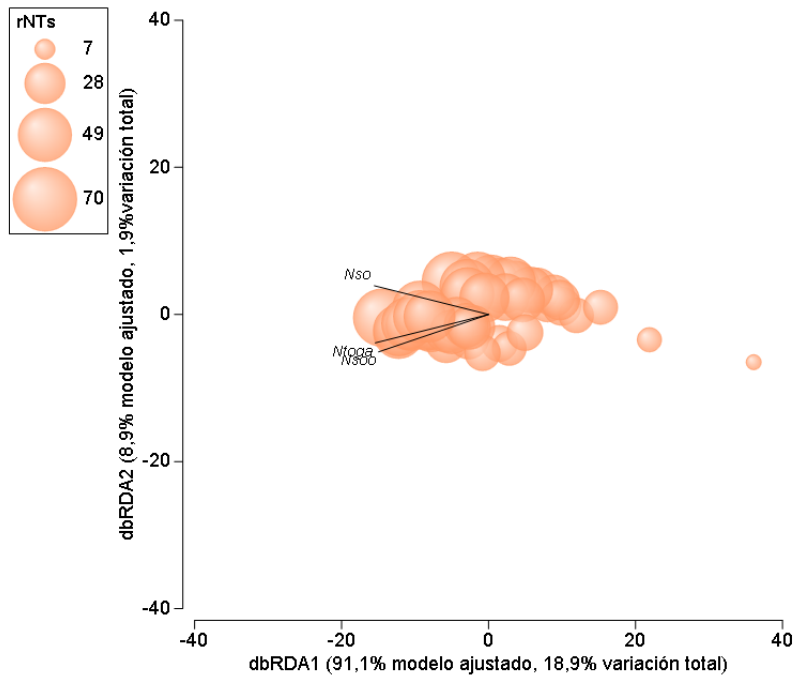


Figura 53. Gráfico de burbujas del rendimiento de eliminación del nitrógeno total soluble (rNTs) en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las fracciones del nitrógeno en el efluente, sus rendimientos de eliminación y variables biológicas en la EDAR CT.

Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson de las variables biológicas mayores de 0,40 y -0,40. Nso, *Nitrosomonas* spp.; Nsoo, *Nitrosomonas oligotropha*; Ntoga, *Nitrotoga* sp..

El modelo lineal multivariante usado para evaluar las correlaciones entre la población de bacterias nitrificantes y las fracciones del nitrógeno en la EDAR DN (Tabla 14 b), indicó que el N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> del efluente explicó el 11,96% de la variación en las comunidades nitrificantes. El resto de variables no mostraron correlaciones significativas ( $p > 0,05$ ). El N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> del efluente se relacionó positivamente con el eje 1 del dbRDA, el cual explica un 21,04% de la variación. Los coeficientes de correlación múltiple parcial en el modelo relacionaron positivamente el género *Nitrospira* con este eje ( $r = 0,67$ ) y negativamente el grupo de *Nitrosomonas* halotolerantes.

En el gráfico de burbujas, junto con el dbRDA (Figura 54) puede observarse como el género *Nitrospira* se relaciona positivamente con concentraciones de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el efluente superiores a 4 mgN/L, mientras que el grupo de *Nitrosomonas* halotolerantes presenta la tendencia contraria, y sus abundancias fueron mayores cuando las concentraciones de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> estuvieron por debajo de este valor.



Tabla 16. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación y correlaciones de las variables biológicas con los ejes del dbRDA en la EDAR DN

EDAR DN	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3	dbRDA4
% variación explicada	21,04	6,29	4,49	0,82
Variable	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3	dbRDA4
N-NO <sub>3</sub>	0,55	-0,35	-0,40	0,40
N-NH <sub>4</sub>	0,44	0,71	-0,17	0,35
rNTs	-0,48	0,02	-0,87	-0,02
rNKTs	0,48	0,04	-0,24	-0,84
N-NO <sub>2</sub>	-0,21	0,61	0,01	-0,13
Nso	-0,21	0,27	-0,27	0,10
Nsoo	0,08	-0,32	-0,18	-0,10
Nsoe	-0,44	0,15	-0,07	-0,33
Ntoga	0,00	0,00	0,00	0,00
Ntspa	0,67	-0,05	-0,06	-0,04
Ntb	-0,16	-0,25	-0,19	0,05

rNTs, rendimiento de eliminación del nitrógeno total soluble; N-NH<sub>4</sub>, concentración de amonio; N-NO<sub>3</sub>, concentración de nitrato; rNKTs, rendimiento de eliminación del nitrógeno Kjeldhal soluble; NO<sub>2</sub>, concentración de nitrito. Nso, *Nitrosomonas* spp.; Nsoo, *Nitrosomonas oligotropha*; Nsoe, *Nitrosomonas* halotolerantes; Ntoga, *Nitrotoga* sp.; Ntspa, *Nitrospira* spp.; Ntb, *Nitrobacter* spp.

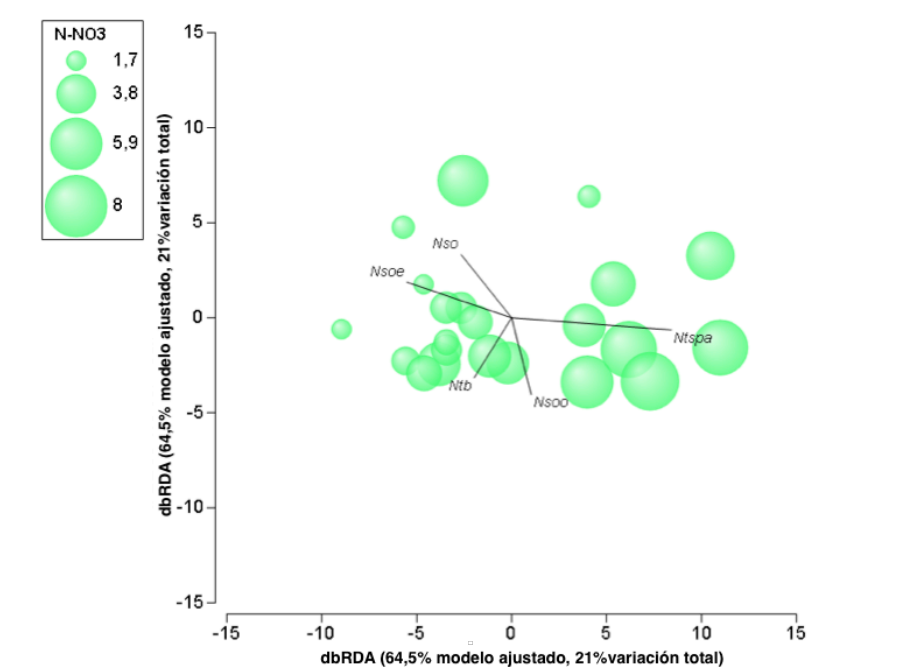


Figura 54. Gráfico de burbujas de la concentración de nitrato en el efluente en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación variables biológicas en la EDAR DN.

Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson de las variables biológicas mayores de 0,40 y -0,40. Nso, *Nitrosomonas* spp.; Nsoo, *Nitrosomonas oligotropha*; Nsoe, *Nitrosomonas* halotolerantes; Ntoga, *Nitrotoga* sp.; Ntspa, *Nitrospira* spp.; Ntb, *Nitrobacter* sp.

El modelo lineal multivariante usado para evaluar las correlaciones entre la población de bacterias nitrificantes y las fracciones del nitrógeno en los reactores de la EDAR QB, indicó que 57,23% de la variación de las comunidades de BN puede explicarse mediante 2 variables, el rNKTs (46,69% de la variación total) y el NTs (10,54% de la variación total) (Tabla 14 c). El rNKTs se relacionó positivamente con el eje 1 del dbRDA ( $r=0,996$ ), el cual explica un 53,78% de la variación. Los coeficientes de correlación múltiple parcial en el modelo correlacionaron significativamente los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrospira* con este eje ( $r = -0,85$ ) y la especie *N. oligotropha* ( $r=-0,69$ ). El eje 2 del dbRDA explica el 3,45% y se relacionó con el NTs del efluente, pero ninguna de las BOA y BON aparecieron relacionadas con este eje.

En el gráfico de burbujas junto con el dbRDA (Figura 55) pueden observarse los coeficientes de Pearson superpuestos como vectores representando la correlación entre positiva entre la abundancia de las BOA y BON detectadas en esta EDAR. Las especies de *Nitrosomonas* positivamente correlacionadas se relacionan con rendimientos de eliminación del NKTs superiores al 75%.

Tabla 17. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación y correlaciones de las variables biológicas con los ejes del dbRDA en la EDAR QB

EDAR QB	dbRDA1	dbRDA2
% variación explicada	53,78	3,45
Variable	dbRDA1	dbRDA2
rNKTs	-0,996	0,088
NTs	0,088	0,996
Nso	-0,85	-0,22
Nsoo	-0,69	0,06
Ntspa	-0,39	0,09

NTs, nitrógeno total soluble; rNKTs, rendimiento de eliminación del nitrógeno Kjeldhal soluble; Nso, *Nitrosomonas* spp.; Nsoo, *Nitrosomonas oligotropha*; Ntspa, *Nitrospira* spp.

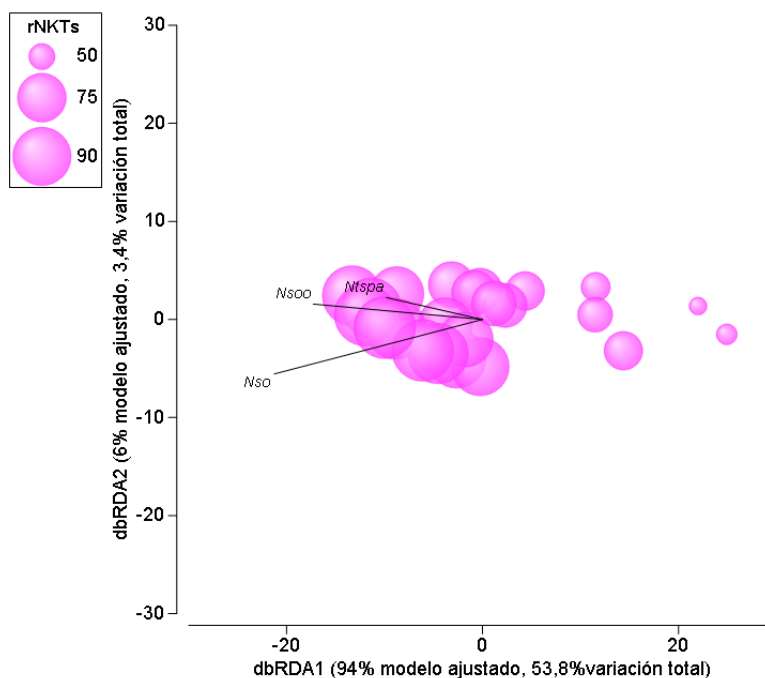


Figura 55. Gráfico de burbujas del rendimiento de eliminación del NKT soluble en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación y variables biológicas en la EDAR QB.

Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson de las variables biológicas mayores de 0,40 y -0,40. Nso, *Nitrosomonas* spp.; Nsoo, *Nitrosomonas oligotropha*; Ntspa, *Nitrospira* spp.

El modelo lineal multivariante seleccionado para relacionar la abundancia de las bacterias nitrificantes con las diferentes fracciones de nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación en el reactor CX explicó un 65,86% de la variación presentada (Tabla 14 d). Sin embargo, hay que tener en cuenta en la interpretación de este modelo que, las variables seleccionadas presentan valores de  $p$  elevados y bajos valores de  $pseudo-F$ , los cuales indican una probabilidad mayor de que la hipótesis verdadera sea nula. Ambos valores indican que el modelo no tiene una buena capacidad explicativa. El test secuencial seleccionó el %N-NO<sub>2</sub> en el efluente como la variable mejor relacionada con la abundancia de las variables ambientales, a pesar de ello no resultó una variable significativa ( $p > 0,05$ ).

#### *Interpretación ambiental de la variación de los rendimientos del nitrógeno.*

Se ha construido un modelo de línea de regresión multivariante, respecto a las variables ambientales y los rendimientos de eliminación de las diferentes fracciones del nitrógeno para cada una de las EDAR analizadas en este apartado. La construcción de los

modelos se ha basado en el uso de criterios y procedimientos más parsimoniosos (*step-wise/AICc* o bien *step-wise/BIC*).

El modelo lineal multivariante en el que se evalúan las correlaciones entre las fracciones del nitrógeno, rendimientos y las variables ambientales en la EDAR CT, indicó que la variación de las fracciones del nitrógeno en el afluente y sus rendimientos de eliminación puede explicarse usando cuatro variables ambientales (O<sub>3</sub>, SSLM, CPTs y DQO). La carga de ozono fue la variable que mejor predijo su comportamiento (18,65% de la varianza explicada) (Tabla 18 a).

Tabla 18. Resultados del test secuencial para el análisis DISTLM realizado entre las variables ambientales y las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación en las EDAR CT, DN, QB y CX.

a) EDAR CT				
Variable	BIC	Pseudo-F	P	Prop.
O <sub>3</sub>	92	10,08	0,001	18,65
SSLM	92	4,10	0,012	7,09
CPTs	90	5,61	0,004	8,76
DQO	89	4,74	0,004	6,78
Variación total explicada				41,27
b) EDAR DN				
Variable	AICc	Pseudo-F	p	% Prop.
ODm	60	3,24	0,006	13,40
CN-NH <sub>4</sub>	60	2,73	0,02	10,41
Variación total explicada				23,81
c) EDAR QB				
Variable	AICc	Pseudo-F	p	% Prop.
CM	57	14,28	0,002	38,30
%DQOs	55	3,98	0,01	9,39
TRHds	55	2,92	0,05	6,39
Variación total explicada				54,10
d) EDAR CX				
Variable	BIC	Pseudo-F	p	% Prop.
CPT	52	11,94	0,002	37,39
SSLM	50	5,26	0,003	13,59
ODa	49	3,95	0,002	8,83
Variación total explicada				59,81

CPT, carga de fósforo total; SSLM, sólidos suspendidos del licor mezcla; ODa, periodo de tiempo en que el oxígeno se mantuvo por encima de 2mg/L en el reactor. CM, carga másica; %DQOs, porcentaje de DQO soluble; TRHds, tiempo de retención hidráulica en el decantador secundario. CN-NH<sub>4</sub>, carga de amonio; ODm, porcentaje de tiempo en que el oxígeno se mantuvo entre 0,8 y 2 mg /L en el reactor. O<sub>3</sub>, concentración de ozono en el reactor; SSLM, sólidos suspendidos en el licor mezcla; PTs, fósforo total soluble. DQO, demanda química de oxígeno.

Los resultados del modelo fueron visualizados usando una rutina dbRDA (Figura 56). Con el objetivo de detectar qué variables presentan mejor correlación con el conjunto de variables ambientales, los vectores de los rendimientos de nitrógeno y las especies de nitrógeno fueron superpuestos en el modelo. Un total del 32,46% de la variación fue explicada por el primer eje; las variables con los coeficientes de correlación más elevados fueron NTs y N-NH<sub>4</sub> ( $r = 0,83$  y  $r = 0,73$  respectivamente). Éstos resultados indican que NTs y N-NH<sub>4</sub> están positivamente correlacionados con el aumento de la concentración de ozono en el reactor. El rendimiento de eliminación del amonio y el rendimiento de eliminación del NKTs también presentaron correlaciones relevantes con el primer eje ( $r = -0,60$  y  $r = -0,56$ , respectivamente). Esta correlación indica que las eficiencias de eliminación de ambas fracciones fueron mayores cuando la concentración de ozono aplicada fue menor.

Tabla 19. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables ambientales y correlaciones de las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación con los ejes del dbRDA en la EDAR CT

EDAR CT	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3	dbRDA4
% variación explicada	32,46	4,90	2,45	1,41
Variable	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3	dbRDA4
O <sub>3</sub>	0,649	0,114	-0,45	-0,602
SSLM	0,616	-0,017	-0,151	0,773
PTs	0,404	0,289	0,855	-0,148
DQO	-0,19	0,95	-0,209	0,132
NTs	0,821	0,152	0,239	0,017
rNTs	-0,449	-0,017	0,007	0,138
N-NH <sub>4</sub>	0,738	-0,014	0,136	0,057
r N-NH <sub>4</sub>	-0,599	0,062	0,063	-0,025
N-NO <sub>2</sub>	-0,494	0,330	0,172	0,125
N-NO <sub>3</sub>	-0,509	-0,132	0,260	-0,215
rNKTs	-0,562	-0,013	0,068	0,100
%NO <sub>2</sub>	0,007	0,493	-0,122	-0,134

NTs, nitrógeno total soluble; rNTs, rendimiento de eliminación del nitrógeno total soluble; N-NH<sub>4</sub>, concentración de amonio; rN-NH<sub>4</sub>, rendimiento de eliminación del amonio; N-NO<sub>2</sub>, concentración de nitrito; N-NO<sub>3</sub>, concentración de nitrato; NKT, nitrógeno Kjeldahl; NKTs, nitrógeno Kjeldahl soluble; %N-NO<sub>2</sub>, porcentaje de nitrito respecto al nitrógeno total en el efluente. O<sub>3</sub>, concentración de ozono en el reactor; SSLM, sólidos suspendidos en el licor mezcla; PTs, fósforo total soluble. DQO, demanda química de oxígeno.

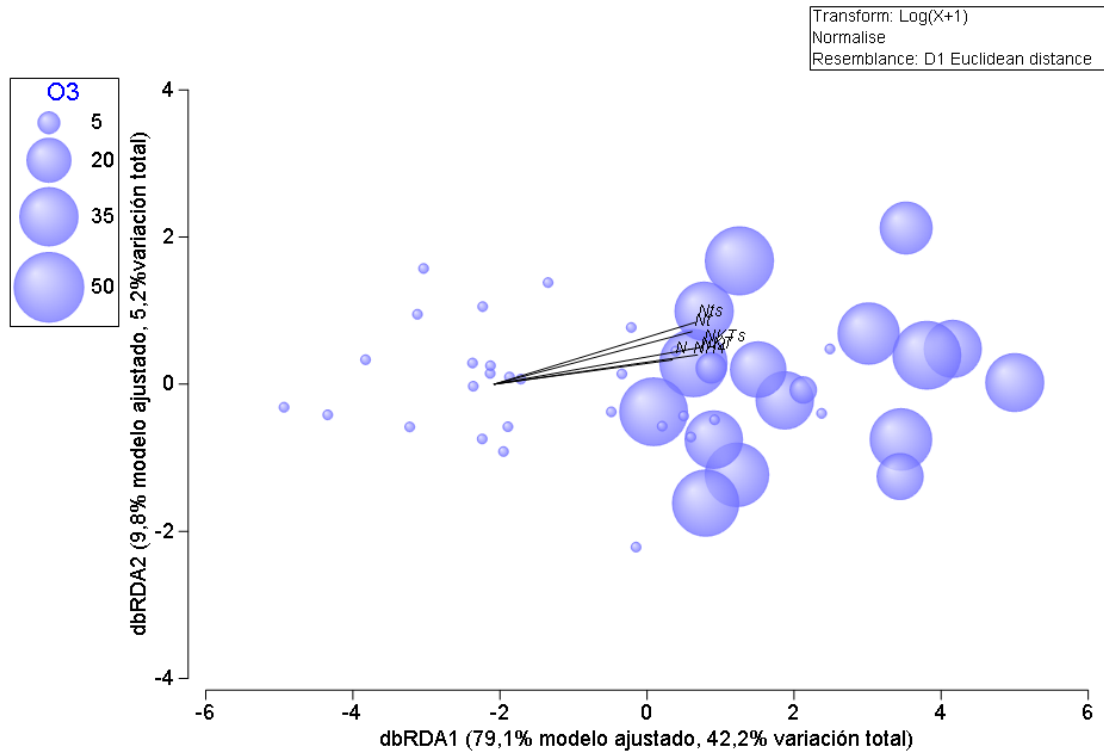


Figura 56. Gráfico de burbujas de la concentración de ozono en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las variables ambientales y las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación en la EDAR CT.

Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson de las variables de los rendimientos mayores de 0,40 y -0,40. NTs, nitrógeno total soluble; rNTs, rendimiento de eliminación del nitrógeno total soluble; N-NO<sub>3</sub>, concentración de nitrato en el efluente.

El 23,81 % de la variabilidad observada en los rendimientos de eliminación del nitrógeno en la EDR DN fue explicada mediante dos variables ambientales: ODm y CN-NH4 (Tabla 18 b).

Con el objetivo de detectar qué variables mostraron las mejores correlaciones con el conjunto de variables ambientales, los coeficientes de correlación de Pearson fueron calculados (Tabla 20) y posteriormente superpuestos en el modelo como vectores (Figura 57).

Tabla 20. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables ambientales y correlaciones de las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación con los ejes del dbRDA en la EDAR CT

EDAR DN	dbRDA1	dbRDA2
% variación explicada	17,13	6,68
Variable	dbRDA1	dbRDA2
ODm	0,81	0,59
CN-NH4	0,59	-0,81
Nts	0,43	-0,29
rNts	0,09	-0,44
N-NH4	-0,22	0,22
rN-NH4	0,30	-0,24
N-NO2	-0,09	0,03
N-NO3	0,62	0,00
%N-NO2	-0,24	-0,04

NTs, nitrógeno total soluble; rNTs, rendimiento de eliminación del nitrógeno total soluble; N-NH4, concentración de amonio; rN-NH4, rendimiento de eliminación del amonio; N-NO2, concentración de nitrito; N-NO3, concentración de nitrato; NKT, nitrógeno Kjeldahl; NKTs, nitrógeno Kjeldahl soluble; %N-NO2, porcentaje de nitrito respecto al nitrógeno total en el efluente. CN-NH4, carga de amonio; ODm, porcentaje de tiempo en el que el oxígeno se agotó entre 0,8 y 2 mg /L en el reactor.

El 17,13% de la variación fue explicado por el eje de ordenación 1; el nitrato efluente fue la única variable que mostró un coeficiente de correlación elevado y significativo con este eje. Este resultado indica que un mayor periodo del tiempo con la concentración de oxígeno medio elevada se relaciona con un aumento del nitrato en el efluente.

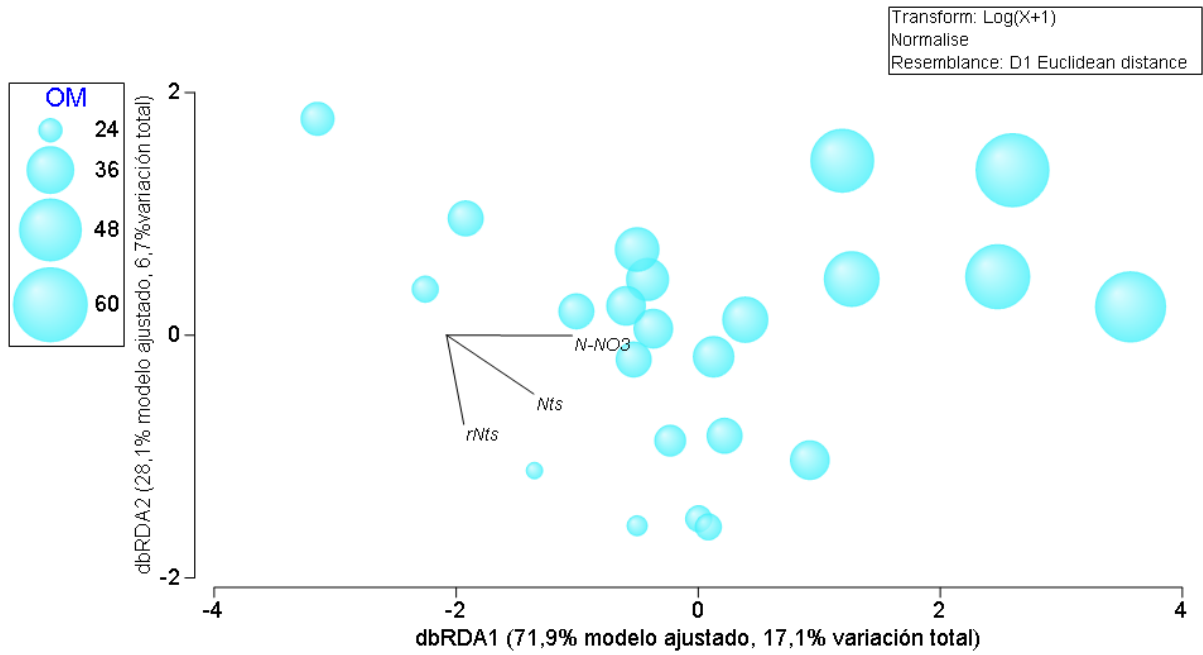


Figura 57. Gráfico de burbujas del porcentaje de tiempo que el oxígeno se mantuvo entre 0,8 y 2 mg/L en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las variables ambientales y las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación en la EDAR DN. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson de las variables de los rendimientos mayores de 0,40 y -0,40. NTs, nitrógeno total soluble rNTs, rendimiento de eliminación del nitrógeno total soluble; N-NO<sub>3</sub>, concentración de nitrato en el efluente.



El modelo seleccionado para relacionar las variables ambientales de la EDAR QB y los rendimientos de eliminación del nitrógeno estableció que el 54,10% de la variación puede ser explicada mediante 3 variables. La CM fue la variable que mayor porcentaje de varianza explica (38,30%) (Tabla 18c). Los coeficientes de correlación entre las variables del modelo y los ejes del dbRDA mostraron una relación significativa de la CM con el eje 1, el cual explicó un 43,75% de la variabilidad observada (Tabla 21).

Las diferentes fracciones del nitrógeno se relacionaron de manera positiva con este eje, a excepción del nitrato en el efluente, mientras que los rendimientos mostraron una relación negativa. Este resultado indica que para valores de la CM mayores de 0,2 los rendimientos de eliminación del amonio y del NTs disminuyeron (Figura 58).

Tabla 21. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables ambientales y correlaciones de las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación con los ejes del dbRDA en la EDAR QB

EDAR QB	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3
% variación explicada	43,75	9,61	0,74
Variable	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3
CM	0,802	0,015	-0,597
%DQOs	0,444	-0,685	0,578
TRHds	0,4	0,729	0,555
Nts	0,795	0,092	0,095
rNts	-0,538	0,241	-0,006
N-NH <sub>4</sub>	0,794	-0,086	0,108
rN-NH <sub>4</sub>	-0,691	0,296	-0,007
N-NO <sub>2</sub>	0,515	0,524	-0,126
N-NO <sub>3</sub>	-0,001	0,530	0,138
%N-NO <sub>2</sub>	0,633	0,241	-0,171

NTs, nitrógeno total soluble; rNTs, rendimiento de eliminación del nitrógeno total soluble; N-NH<sub>4</sub>, concentración de amonio; rN-NH<sub>4</sub>, rendimiento de eliminación del amonio; N-NO<sub>2</sub>, concentración de nitrito; N-NO<sub>3</sub>, concentración de nitrato; NKT, nitrógeno Kjeldahl; NKTs, nitrógeno Kjeldahl soluble; %N-NO<sub>2</sub>, porcentaje de nitrito respecto al nitrógeno total en el efluente; CM, carga másica; %DQOs, porcentaje de DQO soluble; TRHds, tiempo de retención hidráulica en el decantador secundario.

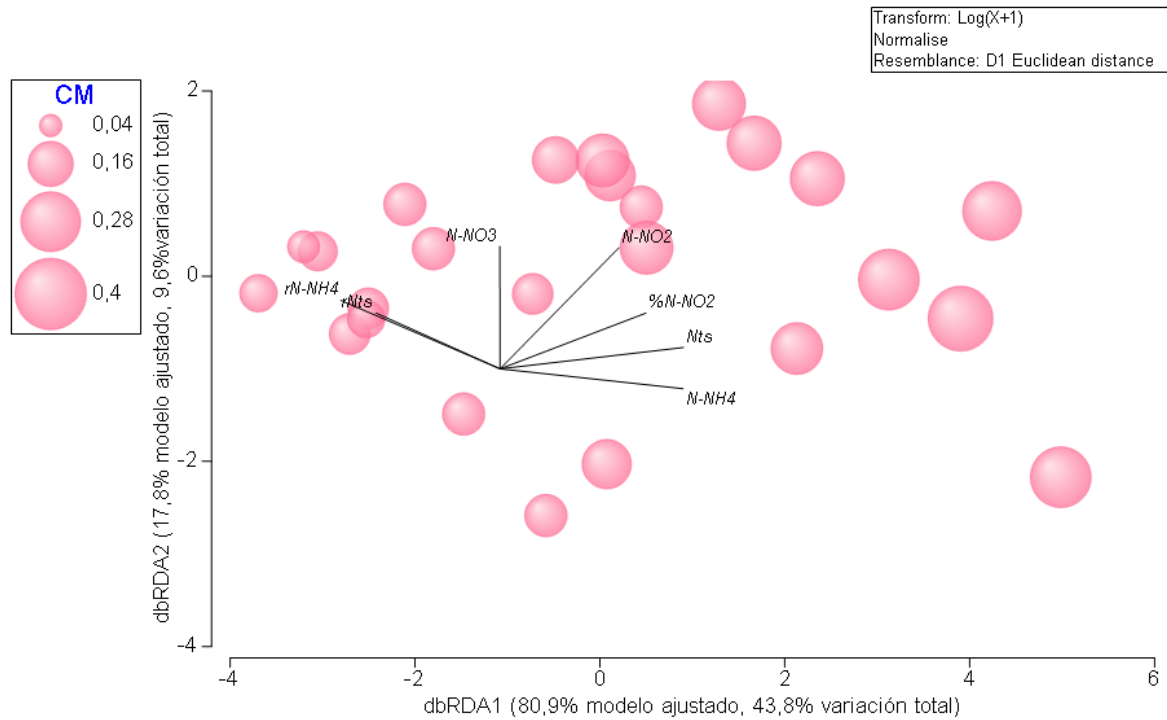


Figura 58. Gráfico de burbujas de la carga másica (CM) en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las variables ambientales y las fracciones del nitrógeno en el efluente y rendimientos de eliminación en la EDAR QB.

Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson de las variables de los rendimientos mayores de 0,40 y -0,40. NTs, nitrógeno total soluble; rNTs, rendimiento de eliminación del nitrógeno total soluble; N-NH<sub>4</sub>, concentración de amonio; rN-NH<sub>4</sub>, rendimiento de eliminación del amonio; N-NO<sub>2</sub>, concentración de nitrito; N-NO<sub>3</sub>, concentración de nitrato; NKT, nitrógeno Kjeldahl; NKTs, nitrógeno Kjeldahl soluble; %N-NO<sub>2</sub>, porcentaje de nitrito respecto al nitrógeno total en el efluente.

El porcentaje de DQOs del afluente y el TRHds se relacionaron con el eje 2 de dbRDA (Tabla 21), el cual explicó un 9,61% de la varianza. El nitrato y el nitrito en el efluente presentaron correlaciones significativas con este eje. La figura del dbRDA ha permitido determinar que TRHds superiores a 6 días y porcentajes de DQOs superiores al 47% se asociaron con valores más elevados de ambas fracciones en el efluente (Figura 59).

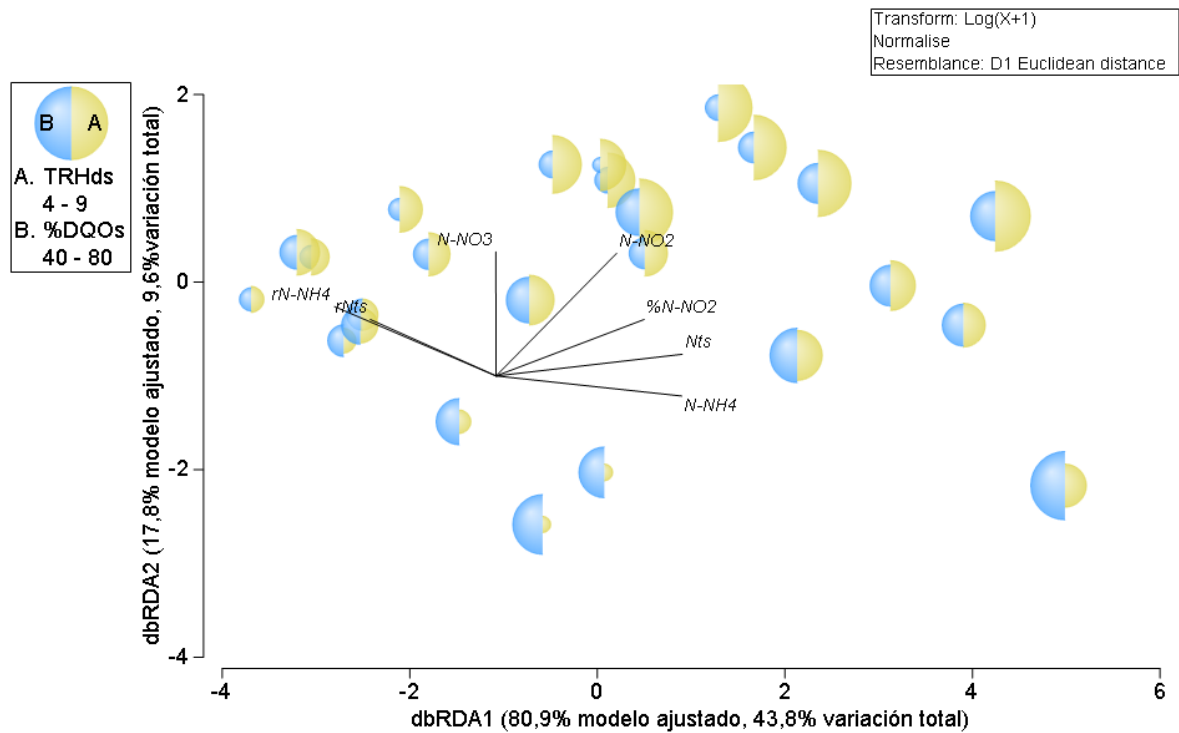


Figura 59. Gráfico de burbujas del tiempo de retención hidráulico en el decantador secundario (TRHds) y el porcentaje de DQO soluble afluente al proceso (%DQOs) en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las variables ambientales y las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación en la EDAR QB.

Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson de las variables de los rendimientos mayores de 0,40 y -0,40. NTs, nitrógeno total soluble; rNTs, rendimiento de eliminación del nitrógeno total soluble; N-NH<sub>4</sub>, concentración de amonio; rN-NH<sub>4</sub>, rendimiento de eliminación del amonio; N-NO<sub>2</sub>, concentración de nitrito; N-NO<sub>3</sub>, concentración de nitrato; NKT, nitrógeno Kjeldahl; NKTs, nitrógeno Kjeldahl soluble; %N-NO<sub>2</sub>, porcentaje de nitrito respecto al nitrógeno total en el efluente.

En la EDAR CX la CPT fue seleccionada como la mejor variable explicativa de los rendimientos de eliminación del nitrógeno (37,39%). Este modelo explicó un 59,8% de la varianza (Tabla 21 d). Los coeficientes de correlación parcial relacionaron esta variable con el eje 1 del dbRDA, el cual explicó un 48,47% de la variabilidad observada. Esta variable se relacionó significativamente con todas las variables respuesta a excepción del rNTs. El rNTs se relacionó con el eje 2 del dbRDA junto con el ODa. Este eje explicó un 8,8% de la variación (Tabla 22).

Tabla 22. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables ambientales y correlaciones de las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación con los ejes del dbRDA en la EDAR CX

EDAR CX	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3
	48,47	8,8	2,55
Variable	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3
CPT	0,957	0,211	-0,202
SSLM	0,235	-0,149	0,96
ODa	-0,172	0,966	0,192
Nts	0,812	0,139	0,221
rNts	-0,044	0,667	-0,055
N-NH4	0,882	0,051	-0,090
rN-NH4	-0,801	0,497	0,100
N-NO2	0,656	0,143	-0,268
N-NO3	-0,518	0,092	0,119
%N-NO2	0,740	0,097	-0,319

NTs, nitrógeno total soluble; rNTs, rendimiento de eliminación del nitrógeno total soluble; N-NH<sub>4</sub>, concentración de amonio; rN-NH<sub>4</sub>, rendimiento de eliminación del amonio; N-NO<sub>2</sub>, concentración de nitrito; N-NO<sub>3</sub>, concentración de nitrato; NKT, nitrógeno Kjeldahl; NKTs, nitrógeno Kjeldahl soluble; %N-NO<sub>2</sub>, porcentaje de nitrito respecto al nitrógeno total en el efluente; CPT, carga de fósforo total; SSLM, sólidos suspendidos del licor mezcla; ODa, periodo de tiempo en que el oxígeno se mantuvo por encima de 2mg/L en el reactor.

Cargas de fósforo superiores a 20 mgP/gSSVLM (Figura 60) se relacionaron con peores rendimientos de la nitrificación, mientras que las menores concentraciones de nitrato en el afluente se asociaron con la tendencia contraria. En esta EDAR el porcentaje mayor de ODa en el reactor se asoció con mejores rendimientos de eliminación del NT y el NTs.

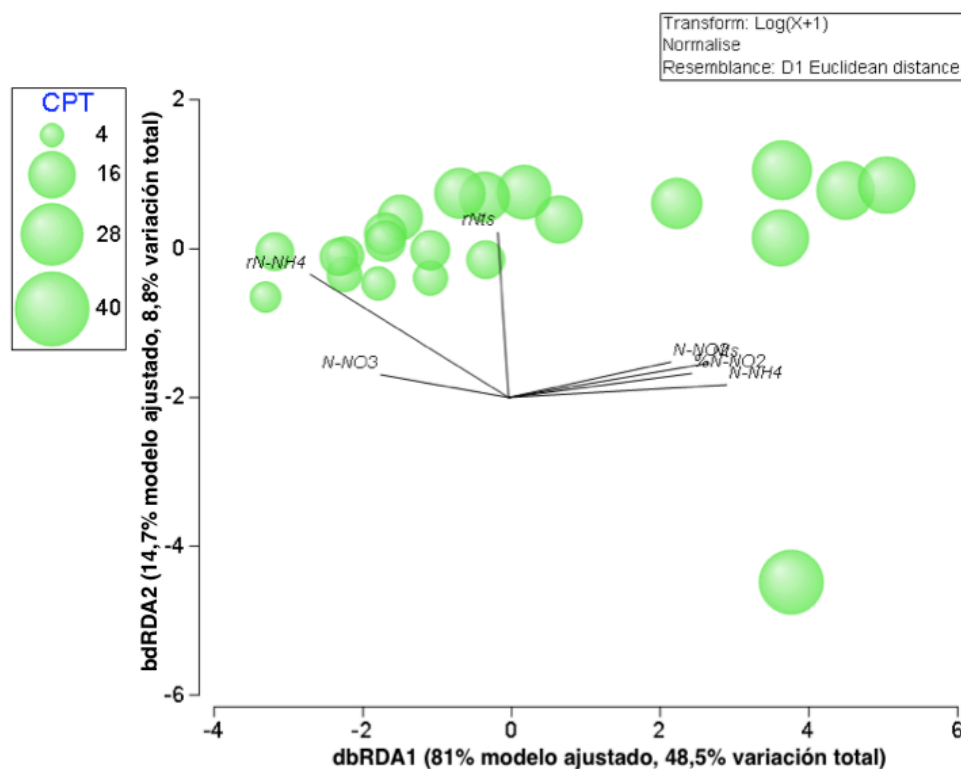


Figura 60. Gráfico de burbujas de la carga de fósforo total (CPT) en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las variables ambientales y las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación en la EDAR CX.

Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson de las variables de los rendimientos mayores de 0,40 y -0,40. NTs, nitrógeno total soluble; rNTs, rendimiento de eliminación del nitrógeno total soluble; N-NH<sub>4</sub>, concentración de amonio; rN-NH<sub>4</sub>, rendimiento de eliminación del amonio; N-NO<sub>2</sub>, concentración de nitrito; N-NO<sub>3</sub>, concentración de nitrato; NKT, nitrógeno Kjeldahl; NKTs, nitrógeno Kjeldahl soluble; %N-NO<sub>2</sub>, porcentaje de nitrito respecto al nitrógeno total en el efluente.

## 4.2 ESTUDIO DE LA DINÁMICA POBLACIONAL DE LAS BACTERIAS NITRIFICANTES EN LA EDAR ML.

### 4.2.1 Resultados de la aplicación de la técnica FISH para la identificación y cuantificación de bacterias nitrificantes en la EDAR ML

#### *Evolución temporal de la población de las bacterias nitrificantes.*

La técnica FISH fue utilizada para caracterizar y cuantificar la comunidad BOA y BON presentes en los reactores aerobios de la EDAR ML. En el siguiente apartado se

analiza la distribución temporal de la abundancia relativa de ambos grupos de bacterias nitrificantes. En la Tabla 23 se muestran los resultados del promedio, desviación estándar y rango de los resultados de la cuantificación de estas especies.

Tabla 23. Media (M), desviación estándar (DE), valor máximo (Mx) y valor mínimo (Mn) de la abundancia relativa (%) de bacterias nitrificantes en la EDAR ML

Variables biológicas	EDAR ML			
	M	DE	Mx	Mn
<i>Nitrosomonas spp</i>	1,0	0,5	3	<1%
<i>N. oligotropha</i>	0,2	0,2	1	0
<i>N. halophila-eutropha</i>	0,3	0,3	1	0
<i>N. europaea</i>	0,0	0,0	0	0
<i>Nitrosococcus Mobilis</i>	0,0	0,0	0	0
<i>Nitrolanceetus hollandicus</i>	0,0	0,0	0	0
<i>Nitrospira spp</i>	0,1	0,2	1	0
<i>Nitrotoga sp</i>	0,2	0,3	1	0
<i>Nitrobacter spp</i>	0,0	0,0	<1%	0
Subgrupo thaumarchaeota	0,0	0,0	0	0
<i>Nitrosopuymilus maritimus</i>	0,0	0,0	0	0

Del total de sondas FISH utilizadas en este estudio, 3 dieron señales positivas para las BOA y 3 para las BON. *Nitrosomonas* fue el género dominante responsable de la oxidación del amonio durante el periodo de estudio. En la Figura 62 pueden verse imágenes de las BN más frecuentes en esta EDAR.

La sonda Nso1225<sub>LNA</sub> utilizada para identificar este género dio resultados positivos en un 100% de las muestras analizadas. La abundancia promedio de *Nitrosomonas spp.* fue del 1%.

Esta comunidad estuvo representada por la especie *N. oligotropha* y el grupo de *Nitrosomonas* halotolerantes. *N. oligotropha*, identificada con la sonda Nmo218, dio resultados positivos en un 76% de las muestras analizadas y representó un promedio del 21% respecto al total de total de *Nitrosomonas* detectadas por la correspondiente sonda de género. El grupo de *Nitrosomonas* halotolerantes, identificadas con la sonda NEU, dio resultados positivos en un 74% de las muestras analizadas y representó un promedio del 24% respecto al total de total de *Nitrosomonas* detectadas por la correspondiente sonda de género. Ambas especies mostraron abundancias promedio menores el 1%. No se observó la presencia de las especies *Nitrosococcus mobilis* (sonda NmV) y del linaje *Nitrosomonas europea-eutropha* (sonda Nse1472), todas ellas representantes del grupo de las BOA. Tampoco se observaron

señales positivas de *Thaumarchaeota* grupo I.1b (sonda Thau1162) y *Candidatus Nitrosopuymilus maritimus* (sonda Cren679) correspondientes al grupo de AOA.

Los géneros dominantes responsables de la oxidación del nitrito fueron *Nitrospira* (sonda Ntspa662) y *Nitrotoga* (sonda Ntoga122). El género *Nitrospira* dio resultados positivos en un 61% de las muestras analizadas, mientras que el género *Nitrotoga* lo hizo en un 55%. El género *Nitrobacter* (sonda NIT3) estuvo presente en menor abundancia relativa, concretamente apareció en el 12% de las ocasiones. Todas las BON mostraron una abundancia relativa promedio menor del 1%. No se observaron señales positivas de la especie *Nitrolancetus hollandicus* (sonda Ntlc804).

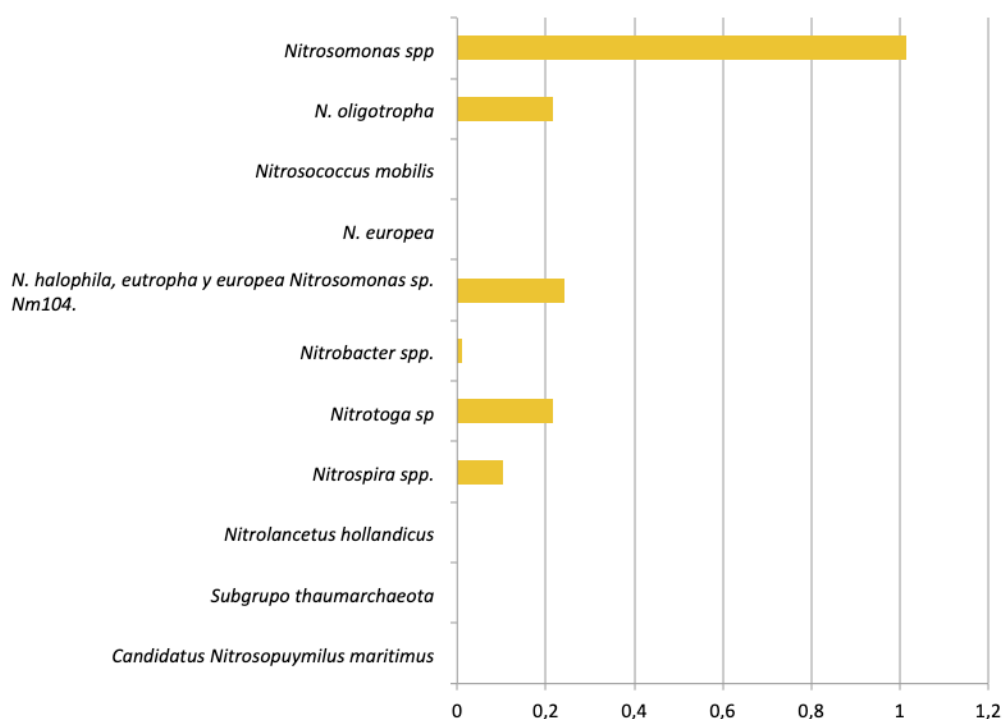


Figura 61. Diagrama del promedio de aparición de las diferentes especies de bacterias oxidantes del amonio y nitrito en la EDAR ML.

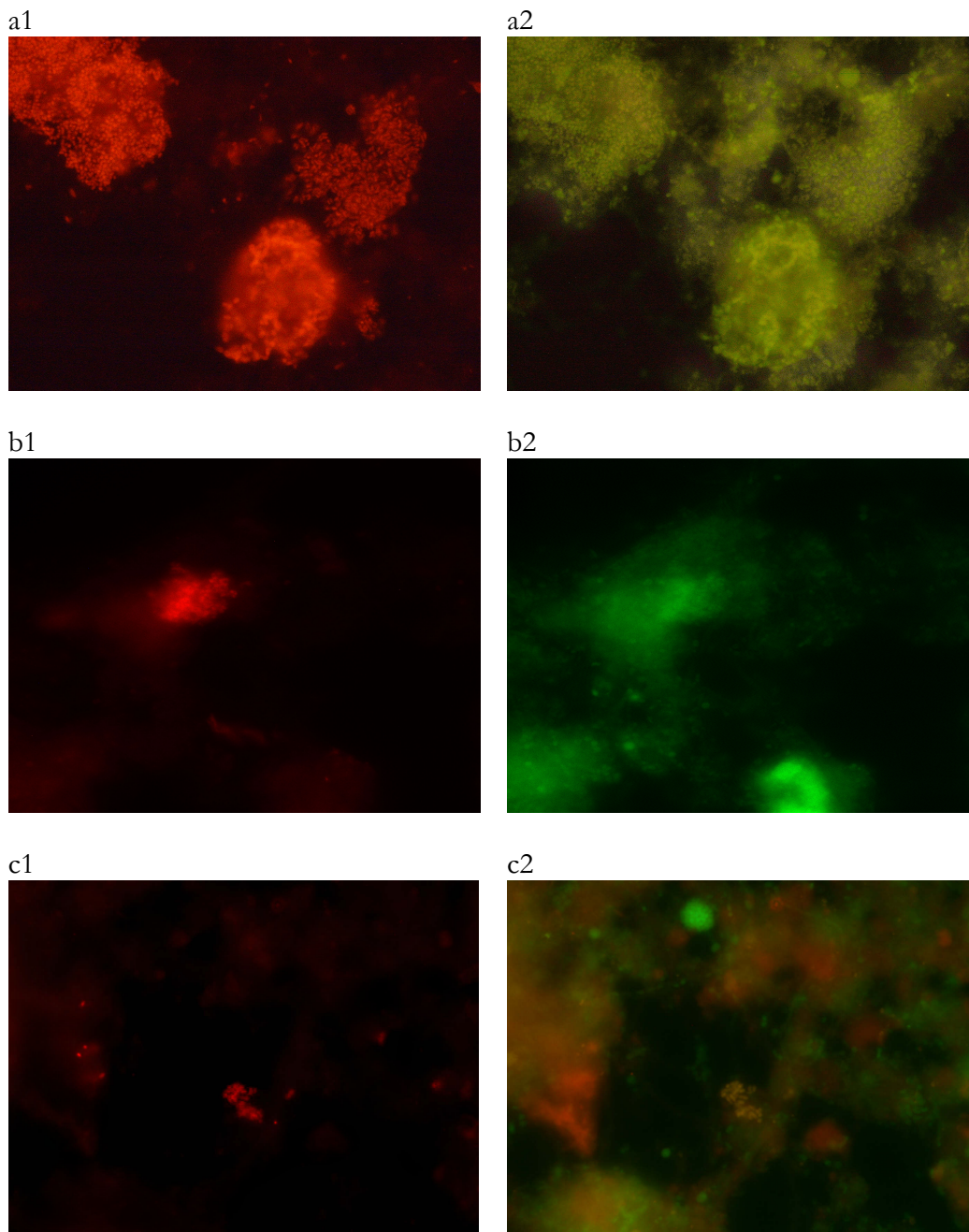


Figura 62. Bacterias oxidantes del amonio y nitrito más frecuentes en la EDAR ML.  
a1) sonda Nso1225, a2) Mismo campo sondas EUB338mix, 600X; b1) sonda Ntog122, b2) Mismo campo sondas EUB338mix, 1000X; c1) sonda NEU, c2) Mismo campo sondas EUB338mix y sonda NEU, 1000x.



En el gráfico de barras de la Figura 63 se representa la composición de comunidad nitrificante según la abundancia relativa determinada por FISH en cada una de las muestras analizadas. Este gráfico nos permite observar con detalle la variabilidad relativa a composición y abundancia de los diferentes grupos taxonómicos.

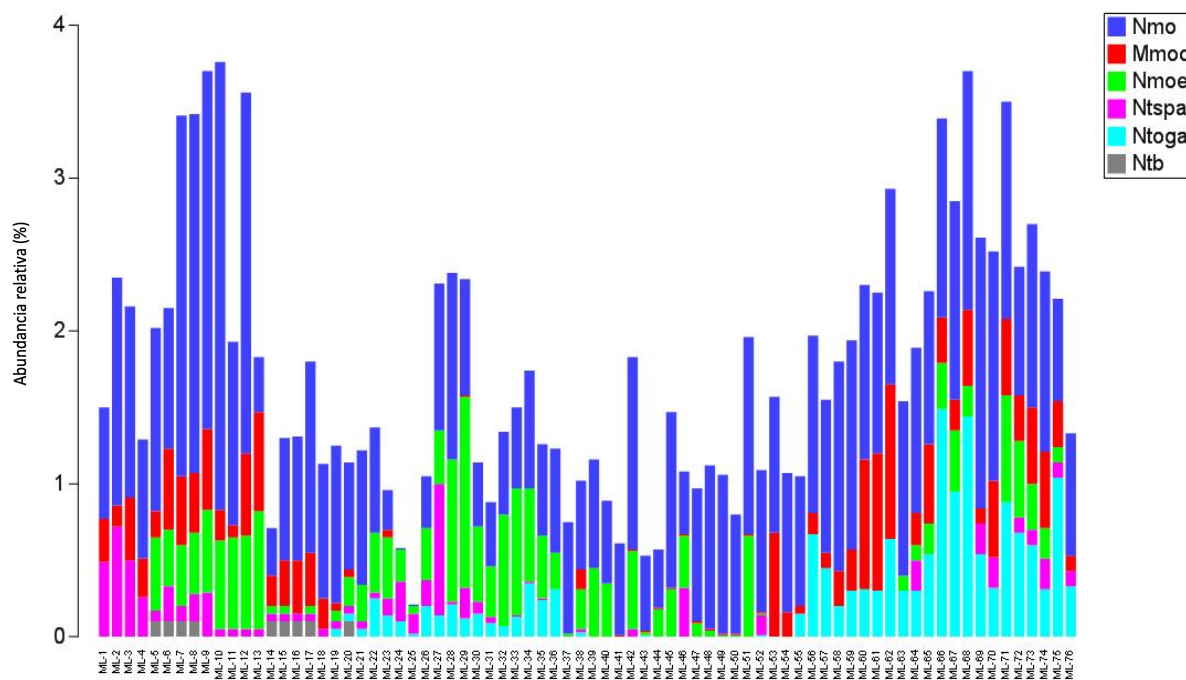


Figura 63. Evolución temporal de la abundancia de bacterias nitrificantes en la EDAR ML determinada por FISH.

Nmo, *Nitrosomonas* spp.; Nmoo, *Nitrosomonas oligotropha*; Nmoe, *Nitrosomonas* halotolerantes; Ntoga, *Nitrotoga* sp.; Ntspa, *Nitrospira* spp.; Ntb, *Nitrobacter* spp.

Se aplicaron diversas técnicas estadísticas para explorar del conjunto de variables biológicas correspondientes a los géneros y especies de BOA y BON, que fue posible cuantificar. El objetivo de esta exploración fue determinar las diferencias en la comunidad de bacterias nitrificantes respecto al factor temporal y analizar las correlaciones entre las variables biológicas y dichos factores.

En el gráfico de trazado sombreado (Figura 64) se han superpuesto los clúster generados a partir de las matrices distancia en las que se observa como las muestras se agrupan por similitud. Además de la abundancia de los diferentes grupos de BN, se observan las siguientes agrupaciones: linajes *N. oligotropha* y el género *Nitrotoga*, género

*Nitrosomonas* junto con el linaje de *Nitrosomonas* halotolerantes, y el género *Nitrospira* (BON) es el más cercano en el dendrograma a las BOA.

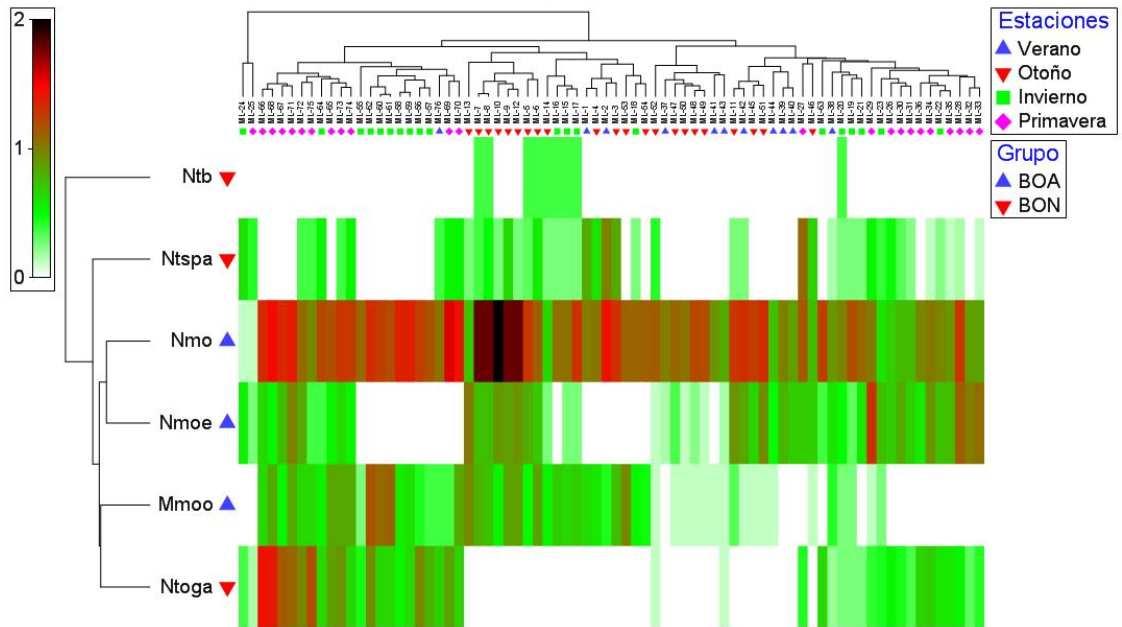


Figura 64. Raíz cuadrada de la abundancia relativa de las poblaciones nitrificantes detectadas por FISH en la EDAR ML representada a través del gráfico de trazado sombreado.

Nmo, *Nitrosomonas* spp.; Nmoo, *Nitrosomonas oligotropha*; Nmoe, *Nitrosomonas* halotolerantes; Ntoga, *Nitrotoga* sp.; Ntspa, *Nitrospira* spp.; Ntb, *Nitrobacter* spp.

Con el objetivo de evaluar posibles patrones temporales se realizó un análisis nMDS respecto al factor estacional y en función de la abundancia relativa de las variables biológicas (Figura 65). El nMDS no mostró patrones de distribución significativos (estrés >0,2). Este resultado fue contrastado con un análisis de similitud ANOSIM, el cual dio como resultado un valor del estadístico R de 0,31. Este valor indica que no existen diferencias significativas respecto al factor estacional.

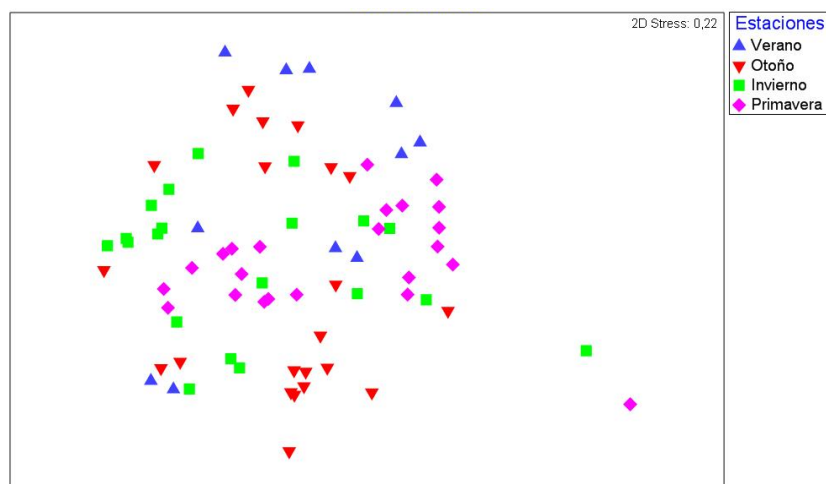


Figura 65. Análisis nMDS a partir de la abundancia relativa de bacterias nitrificantes según el factor estacional en la EDAR ML.

### *Interpretación ambiental de la dinámica poblacional de las bacterias nitrificantes*

Se ha construido un modelo de lineal de regresión multivariante, respecto a las variables ambientales, para la interpretación de la dinámica poblacional de las BN en las 76 muestras analizadas de la EDAR ML por FISH. La construcción del modelo se ha basado en el uso de criterios y procedimientos más parsimoniosos (*step-wise/BIC*).

El modelo lineal multivariante usado para evaluar las correlaciones entre la población de bacterias nitrificantes y las fracciones del nitrógeno en los reactores de la EDAR ML, indicó que el 32,20% de la variación de las comunidades de bacterias nitrificantes puede ser explicado usando cuatro variables ambientales (Tabla 24). El %SSVLM fue la variable que mejor predijo su comportamiento (10,4% de la varianza explicada), seguida de la  $T^a_r$ , los SSLM, la CPTs y la  $CN-NH_4$ .

Los resultados del modelo fueron visualizados usando un dbRDA (Figura 66). Con el objetivo de detectar qué variables mostraron las mejores correlaciones con el conjunto de variables ambientales, los coeficientes de correlación de Pearson fueron superpuestos en el modelo como vectores. El 15,9% de la variación fue explicado por el eje de ordenación 1 (Tabla 25); la única variable biológica con un coeficiente de correlación significativo con este eje fue el género *Nitrosomonas* ( $r = 0,41$ ). Estos resultados indican que la abundancia de

*Nitrosomonas* se relacionó positivamente con el %SSVLM y la CN-NH<sub>4</sub>. Tal y como se muestra en el dbRDA de la Figura 66, %SSVLM superiores al 87% se correlacionaron positivamente con la abundancia de este género.

Tabla 24. Resultados del test secuencial para el análisis DISTLM realizado entre las variables ambientales y bacterias nitrificantes en la EDAR ML.

Variable	BIC	Test secuencial		
		Pseudo-F	p	Prop
%SSVLM	508	8,63	0,001	10,43
T <sup>a</sup> r	508	4,77	0,002	5,49
SSLM	507	5,24	0,002	5,70
CPTs	505	5,42	0,001	5,56
CN-NH <sub>4</sub>	504	5,14	0,001	4,98
Variación total explicada				32,20

%SSVLM, porcentaje de sólidos suspendidos en el licor mezcla; T<sup>a</sup>r, temperatura en el reactor biológico; SSLM, sólidos suspendidos del licor mezcla. CPTs, concentración de fósforo total en el afluente al reactor biológico; CN-NH<sub>4</sub>, concentración de nitrógeno amoniacal en el afluente al reactor biológico.

El segundo eje de ordenación explicó un 9,27% de la variación en la comunidad de BN; el género *Nitrotoga* mostró una correlación negativa con este eje ( $r = -0,463$ ). Los resultados obtenidos indican que la abundancia de *Nitrotoga* sp. se relacionó con T<sup>a</sup>r menores a 23°C, tal y como se observa en el dbRDA.

Tabla 25. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables ambientales y correlaciones de las variables biológicas con los ejes del dbRDA en la EDAR ML

	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3	dbRDA4
% variación explicada	15,89	9,27	6,04	1,00
Variable	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3	dbRDA4
%SSVLM	0,708	0,026	-0,012	0,161
T <sup>a</sup> r	-0,041	0,810	0,108	0,563
SSLM	0,353	0,401	-0,634	-0,488
CPTs	-0,132	-0,321	-0,729	0,590
CN-NH <sub>4</sub>	0,596	-0,284	0,235	0,266
Nso	0,413	0,110	-0,423	0,110
Nsoo	0,202	-0,128	-0,394	-0,128
Nsoe	-0,381	0,005	0,384	0,005
Ntspa	-0,178	-0,109	0,048	-0,109
Ntoga	-0,293	-0,463	-0,110	-0,463
Ntb	0,089	-0,018	-0,013	-0,018

%SSVLM, porcentaje de sólidos suspendidos en el licor mezcla; T<sup>a</sup>r, temperatura en el reactor biológico; SSLM, sólidos suspendidos del licor mezcla. CPTs, concentración de fósforo total en el afluente al reactor biológico; CN-NH<sub>4</sub>, concentración de nitrógeno amoniacal en el afluente al reactor biológico.

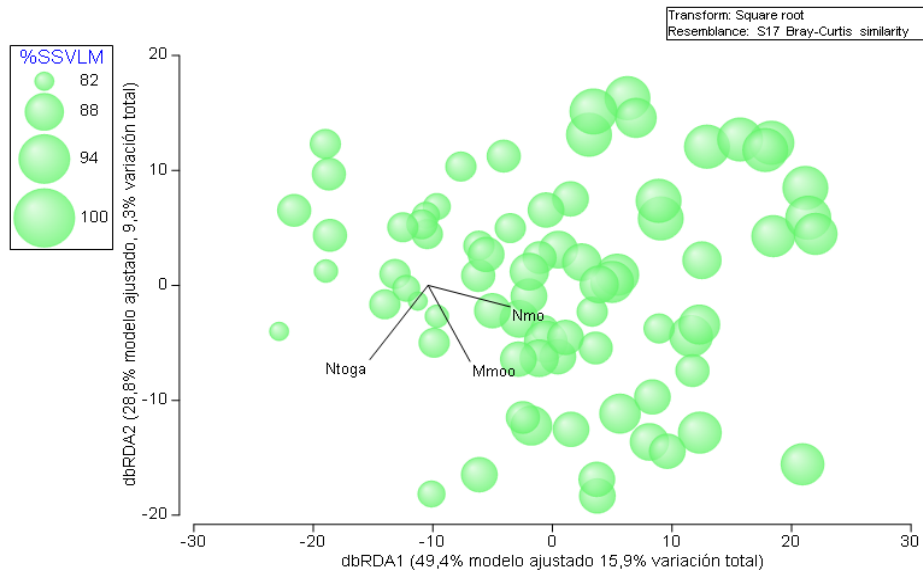


Figura 66. Gráfico de burbujas del porcentaje de sólidos suspendidos volátiles del licor mezcla (%SSVLM) en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las variables ambientales y biológicas determinadas por FISH en la EDAR ML.

Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson de las variables biológicas mayores de 0,40 y -0,40. Nmo, *Nitrosomonas* spp.; Nmoo, *Nitrosomonas oligotropha*; Ntoga, *Nitrotoga* sp.

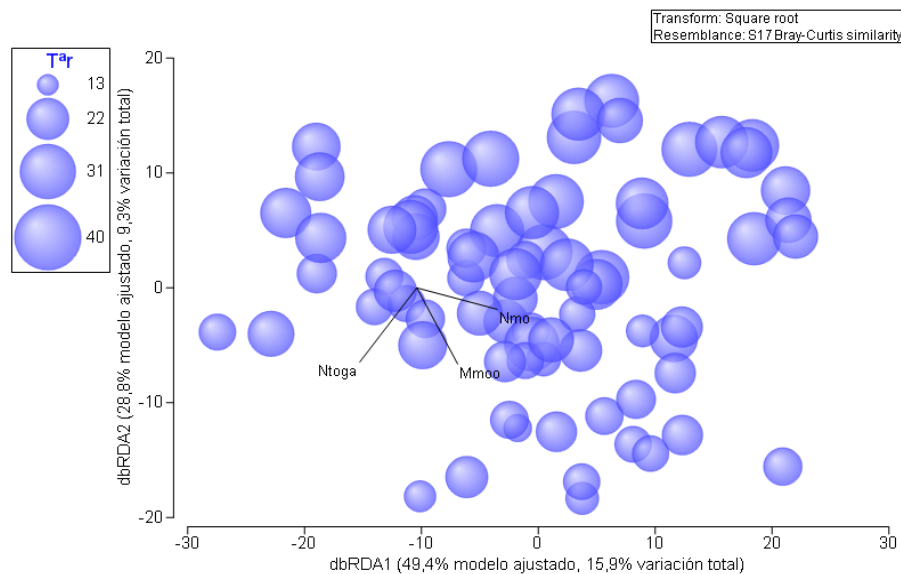


Figura 67. Gráfico de burbujas del porcentaje de la temperatura en el reactor biológico ( $Tr^a$ ) en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las variables ambientales y biológicas determinadas por FISH en la EDAR ML.

Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson de las variables biológicas mayores de 0,40 y -0,40. Nmo, *Nitrosomonas* spp.; Nmoo, *Nitrosomonas oligotropha*; Ntoga, *Nitrotoga* sp.

## 4.2.2 Análisis de los rendimientos de eliminación de nitrógeno en la EDAR ML

### *Evolución temporal de los rendimientos del nitrógeno en la EDAR ML*

En la Figura 68 se representa la evolución de la concentración de las fracciones inorgánicas del nitrógeno en el efluente tratado. De forma significativa, se observan algunos valores elevados del  $\text{N-NH}_4^+$ , correspondientes a los muestreos ML24 y ML25. Los valores de  $\text{N-NO}_2^-$  presentaron bajos valores en general, mientras que los correspondientes al  $\text{N-NO}_3^-$  fueron más elevados. De manera general en este gráfico se observa que en los periodos donde la concentración de amonio fue menor en el efluente, las concentraciones de nitrato fueron mayores.

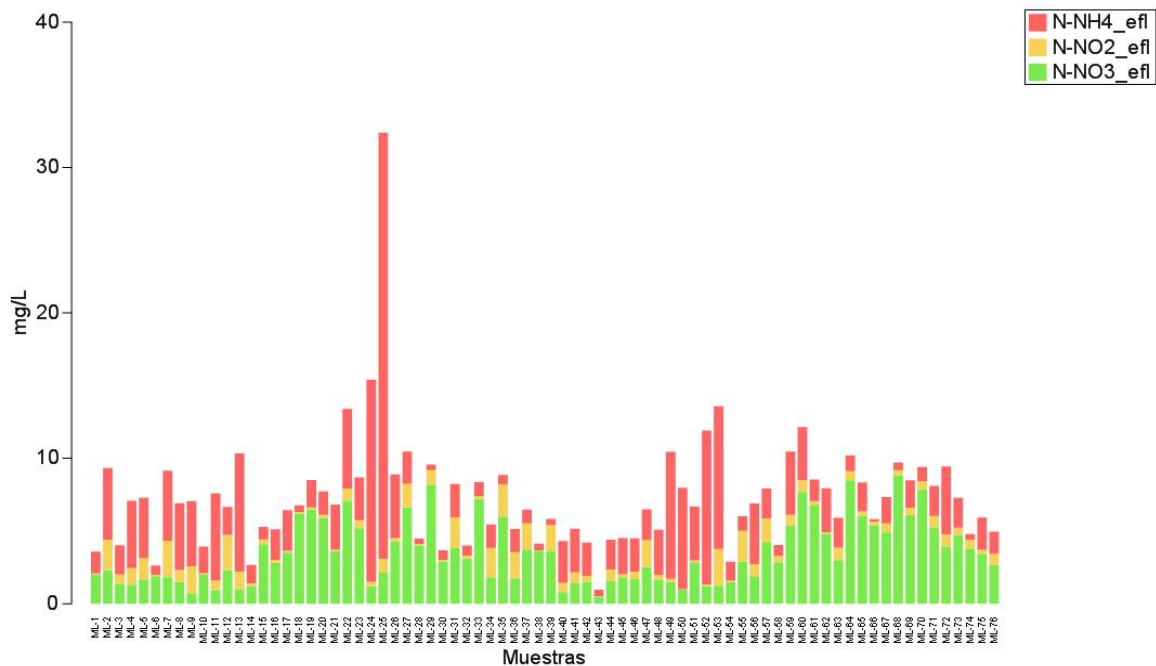


Figura 68. Evolución de la concentración de los componentes inorgánicos del nitrógeno en el efluente de la EDAR ML.  $\text{N-NH}_4$ , concentración de amonio;  $\text{N-NO}_2$ , concentración de nitrito;  $\text{N-NO}_3$ , concentración de nitrato.

En la Figura 69 se pueden observar las concentraciones de las diferentes fracciones del nitrógeno referentes a los procesos de nitrificación-desnitrificación. La concentración de  $\text{N-NH}_4^+$  promedio en el efluente fue de 3,1 mgN/L. Las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$ , las cuales hacen referencia al proceso de desnitrificación, fueron moderadas. De manera general las elevadas desviaciones estándar de cada una de las fracciones del nitrógeno

(exceptuando la fracción de  $\text{NO}_2$ ) indican periodos con buena nitrificación-desnitrificación frente a otros periodos de peor funcionamiento de alguno de estos dos procesos.

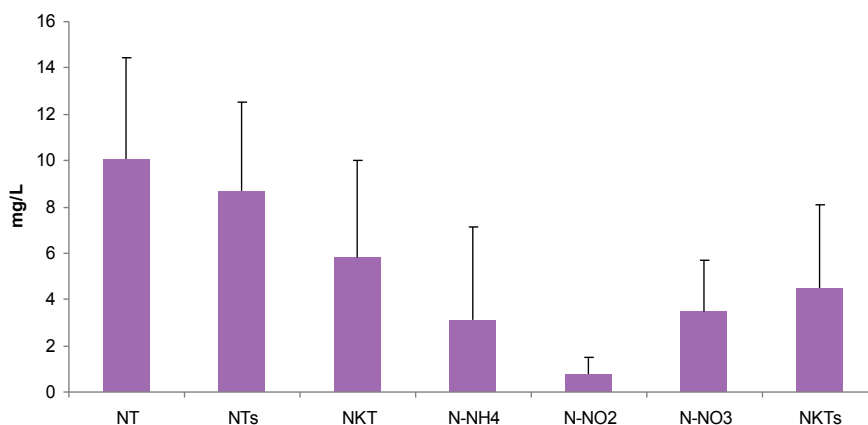


Figura 69. Valores promedio y desviación estándar de las fracciones del nitrógeno del efluente en la EDAR ML. NTs, nitrógeno total soluble; N-NH<sub>4</sub>, concentración de amonio; N-NO<sub>2</sub>, concentración de nitrito; N-NO<sub>3</sub>, concentración de nitrato; NKT, nitrógeno Kjeldahl; NKTs, nitrógeno Kjeldahl soluble.

En la Figura 70 se presentan las eficiencias de eliminación del NT<sub>s</sub>, NKT<sub>s</sub> y N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; el promedio del rN-NH<sub>4</sub> y del rNKT<sub>s</sub> fue superior al 90% en ambos casos, mientras que el rNT<sub>s</sub> promedio fue del 81,6%. Los rNT<sub>s</sub> mostraron valores menores, con periodos donde fueron inferiores al 80%. De manera general los rendimientos no presentaron grandes variaciones respecto a la media, exceptuando la muestra 25 donde los rendimientos mostraron una drástica bajada. El rendimiento del proceso de nitrificación-desnitrificación, representado a través del rendimiento de eliminación del nitrógeno total soluble (rNT<sub>s</sub>), presentó un valor promedio superior al 80%.

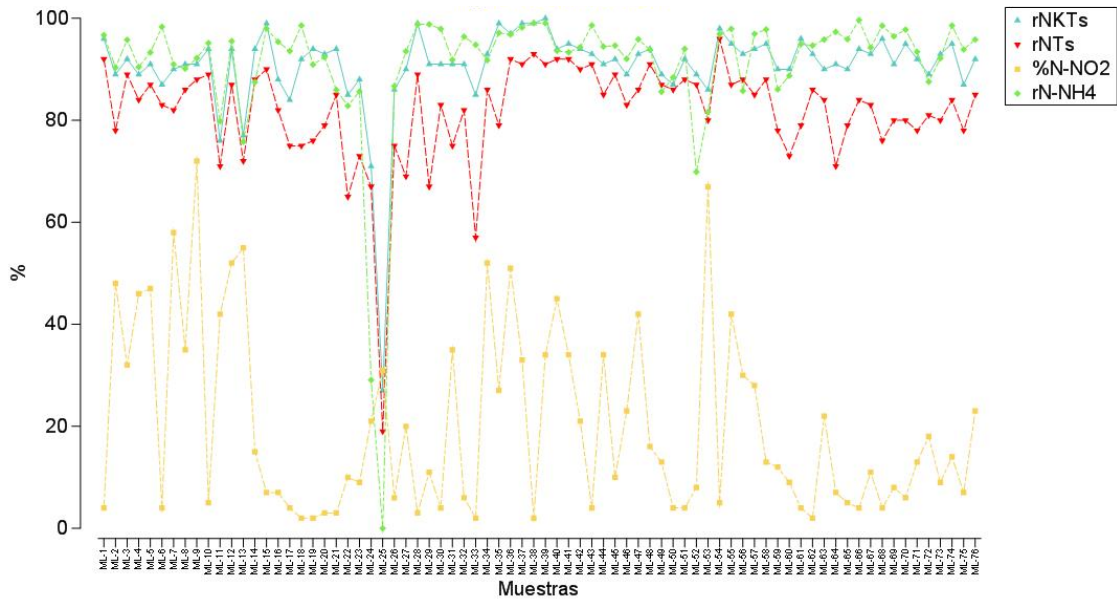


Figura 70. Evolución temporal de los rendimientos del nitrógeno en la EDAR ML. rNTs, rendimiento de eliminación del nitrógeno total soluble; rN-NH<sub>4</sub>, rendimiento de eliminación del amonio; rNKTs, rendimiento eliminación nitrógeno Kjeldahl soluble; %N-NO<sub>2</sub>, porcentaje de nitrito respecto al nitrógeno total en el efluente.

### *Interpretación ambiental de la variación de los rendimientos del nitrógeno.*

Se ha construido un modelo de lineal de regresión multivariante, respecto a las variables ambientales, para la interpretación de los rendimientos de eliminación del nitrógeno en las 76 muestras analizadas de la EDAR ML. La construcción del modelo se ha basado en el uso de criterios y procedimientos más parsimoniosos (*step-wise/AICc*).

El modelo lineal multivariante usado para evaluar las correlaciones entre las fracciones del nitrógeno, rendimientos y las variables ambientales en la EDAR ML, indicó que el 23,93% de la variación de las fracciones del nitrógeno en el afluente y sus rendimientos de eliminación puede explicarse usando cinco variables ambientales (Tabla 26). La T<sup>ra</sup> fue la variable que mejor predijo su comportamiento (8,24% de la varianza explicada), seguida del %SSVLM, la CPTs, el TRHr y la EF.



Tabla 26. Resultados del test secuencial para el análisis DISTLM realizado entre las variables ambientales y las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación en la EDAR ML.

Variable	AICc	Test secuencial		
		Pseudo-F	P	Prop
T <sup>a</sup> r	176	6,55	0,001	8,24
%SSVLM	175	3,48	0,014	4,23
CPTs	173	3,51	0,022	4,12
TRHr	172	3,25	0,02	3,70
TRC	171	3,27	0,017	3,61
Variación total explicada				23,93

T<sup>a</sup>r, temperatura en el reactor biológico; CPTs, concentración de fósforo total soluble; %SSVLM, porcentaje de sólidos suspendidos del licor mezcla; TRHr, tiempo de retención hidráulico en el reactor, TRC, tiempo de retención celular.

Los resultados del modelo fueron visualizados usando un dbRDA (Figura 71). Con el objetivo de detectar qué variables mostraron las mejores correlaciones con el conjunto de variables ambientales, los coeficientes de correlación de Pearson fueron superpuestos en el modelo como vectores. El 11,87% de la variación fue explicado por el eje de ordenación 1 (Tabla 27); este eje se correlacionó con el NT, el N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y el %NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en el efluente, y el rendimiento de eliminación del NTs. El eje de ordenación 2 explicó un 6,96% de la varianza explicada y se relacionó negativamente con el rendimiento de eliminación del N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. T<sup>a</sup>r menores de 23°C y %SSVLM entre 85-82% se relacionaron con la aparición de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NT en el efluente. Valores más elevados de estas variables presentaron una correlación positiva con el rendimiento de eliminación del NTs y el %NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

Tabla 27. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables ambientales y correlaciones de las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación con los ejes del dbRDA en la EDAR ML

	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3	dbRDA4
% variación explicada	11,87	6,96	2,92	2,13
Variable	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3	dbRDA4
T <sup>a</sup> r	-0,738	-0,467	-0,295	-0,367
%SSVLM	-0,569	0,124	0,435	0,677
CPTs	-0,101	0,632	-0,418	-0,044
TRHr	0,156	-0,331	-0,677	0,636
TRC	0,312	-0,507	0,300	0,033
NT_efl	0,420	0,312	-0,146	0,120
NTs_efl	0,356	0,246	-0,135	0,043
NKT_efl	0,066	0,327	0,050	0,221
N-NH4_efl	-0,124	0,297	0,042	0,099
N-NO2_efl	-0,280	0,255	-0,321	-0,127
N-NO3_efl	0,660	-0,047	-0,154	-0,056
NKTs	-0,057	0,212	0,143	0,156
rNKTs	-0,019	-0,244	-0,233	0,113
rNTs	-0,418	-0,089	-0,056	0,233
%N-NO2	-0,539	0,262	-0,182	-0,087
rN-NH4	-0,026	-0,404	-0,198	0,202

NTs, nitrógeno total soluble; rNTs, rendimiento de eliminación del nitrógeno total soluble; N-NH4, concentración de amonio; rN-NH4, rendimiento de eliminación del amonio; N-NO2, concentración de nitrito; N-NO3, concentración de nitrato; NKT, nitrógeno Kjeldahl; NKTs, nitrógeno Kjeldahl soluble; %N-NO2, porcentaje de nitrito respecto al nitrógeno total en el efluente. T<sup>a</sup>r, temperatura en el reactor biológico; CPTs, concentración de fósforo total soluble; %SSLM, porcentaje de sólidos suspendidos del licor mezcla; TRHr, tiempo de retención hidráulico en el reactor, TRC, tiempo de retención celular.

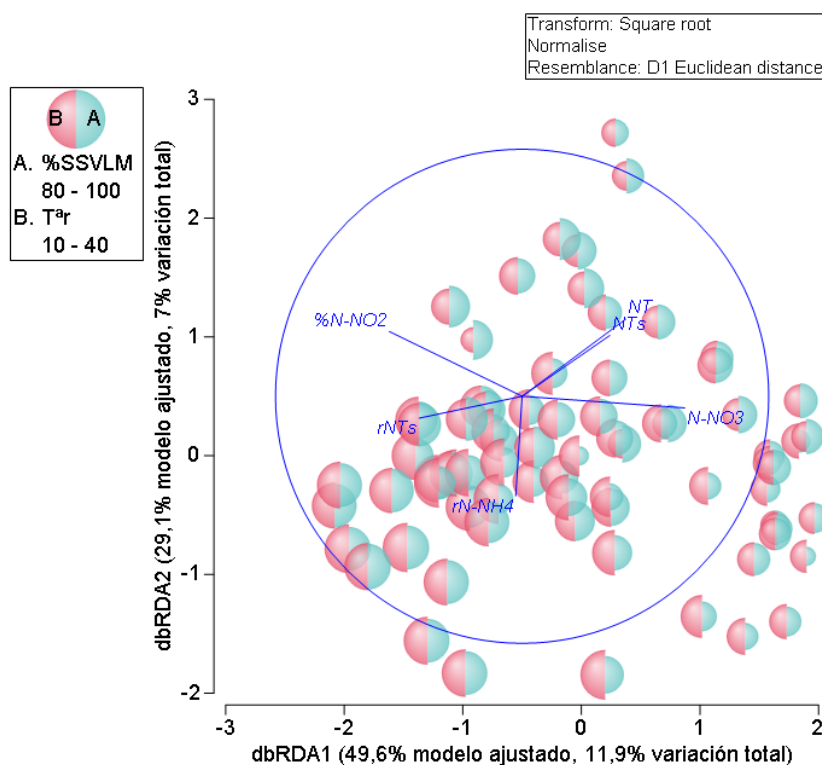


Figura 71. Gráfico de burbujas del %SSVLM y  $T^r$  en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las variables ambientales en la EDAR ML.

Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson de las variables biológicas mayores de 0,40 y -0,40. NT, nitrógeno total; NTs, nitrógeno total soluble; rNTs, rendimiento de eliminación del nitrógeno total soluble; rN-NH<sub>4</sub>, rendimiento de eliminación del amonio; N-NO<sub>3</sub>, concentración de nitrato; %N-NO<sub>2</sub>, porcentaje de nitrito respecto al nitrógeno total en el efluente.

### *Análisis de la contribución de la población de bacterias nitrificantes a la eliminación de amonio en la EDAR.*

El objetivo de este apartado fue la construcción de modelos de interpretación ambiental que ayuden a explicar la contribución de las bacterias nitrificantes a la eliminación del amonio.

El modelo lineal multivariante seleccionado en la EDAR ML establece que el 22,5% de la variación en la abundancia de bacterias nitrificantes fue atribuida al N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, rNTs y NKTs de salida del decantador secundario. Los resultados del test secuencial del modelo (Tabla 28) indican que el N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> contribuyó con el mayor porcentaje de variación (8,8%) respecto al total, mientras que el rNTs y el NKTs contribuyeron con el 7,1 y 6,6%, respectivamente. Los coeficientes de correlación múltiple parcial en el modelo muestran correlaciones negativas del N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> con el dbRDA1y del rNTs con el dbRDA2

Tabla 28. Resultados del test secuencial para el análisis DISTLM realizado entre las bacterias nitrificantes y las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación en la EDAR ML.

Variable	Test secuencial			
	AICc	Pseudo-F	P	Prop
N-NO <sub>3</sub> _efl	494	7,02	0,001	8,81
rNTs	491	6,04	0,002	7,12
NKTs	487	6,08	0,002	6,61
Variación total explicada				22,54

N-NO<sub>3</sub>\_efl, nitrato en el efluente; rNTs, rendimientos del nitrógeno total soluble; NKTs, nitrógeno Kjeldhal soluble en el efluente.

Los coeficientes de correlación de Pearson de las abundancias de las distintas especies de BOA y BON con cada uno de los ejes del dbRDA han sido calculados para identificar su respuesta debido a la variación del N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y del rNT. Los géneros *Nitrotoga* ( $r=-0,503$ ) y *Nitrosomonas* ( $r=0,399$ ) aparecieron relacionados negativamente con este eje, mientras que ninguna de las especies detectada mostró correlaciones con el eje 2 del dbRDA. La figura del análisis de redundancia basado en la distancia (Figura 72), indica que la abundancia de dichos organismos se asocia a valores mayores de 3 mg/L de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

Tabla 29. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación y correlaciones de las variables biológicas con los ejes del dbRDA en la EDAR CT

	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3
% variación explicada	12,40	9,07	1,28
Variable	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3
N-NO <sub>3</sub> _efl	-0,815	0,503	-0,287
rNTs	-0,478	-0,864	-0,157
NKTs	-0,327	0,009	0,945
Nso	-0,399	-0,182	-0,003
Nsoo	-0,337	0,016	0,148
Nsoe	0,264	0,248	-0,024
Ntspa	0,188	0,207	0,164
Ntoga	-0,503	0,376	-0,132
Ntb	0,033	-0,090	0,084

Nso, *Nitrosomonas* spp.; Nsoo, *Nitrosomonas oligotropha*; Nsoe, *Nitrosomonas halotolerantes*; Ntoga, *Nitrotoga* sp.; Ntspa, *Nitrospira* spp.; Ntb, *Nitrobacter* sp.

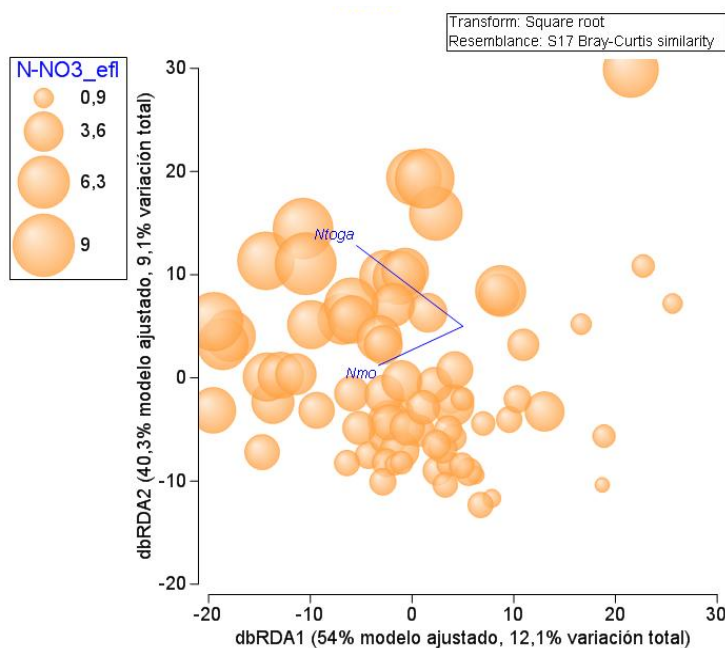


Figura 72. Gráfico de burbujas del  $\text{N-NO}_3^-$  y el rendimiento de los NTs en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación y las variables biológicas determinadas por FISH en la EDAR ML.

Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson de las variables biológicas mayores de 0,40 y -0,40. Nmo, *Nitrosomonas* spp.; Ntoga, *Nitrotoga* sp.

### 4.3 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE LAS BACTERIAS NITRIFICANTES MEDIANTE RESPIROMETRÍA.

Los análisis respirométricos realizados en la EDAR ML permitieron evaluar la actividad de las BN en 33 muestras. Con esta finalidad se determinó la tasa de respiración endógena de las bacterias autótrofas ( $\text{OUR}_{\text{end.A}}$ ) y la tasa de respiración endógena de las bacterias heterótrofas ( $\text{OUR}_{\text{end.H}}$ ), así como las tasas de respiración máxima por nitrificación ( $R_s$ ) y sus correspondientes tasas específicas de respiración ( $\text{SOUR}_{\text{end.A}}$ ,  $\text{SOUR}_{\text{end.H}}$  y  $R_{\text{sp}}$ , respectivamente). A partir de estas tasas se calculó la tasa de oxidación del amonio (AUR).

#### 4.3.1 Evolución temporal de la actividad nitrificante en el EDAR ML

En la Figura 73 se representa la evolución de las tasas de respiración endógena determinadas en el fango activo de la EDAR ML. La tasa de respiración endógena global

(OUR<sub>end</sub>) presentó un valor promedio de 19,81 mgO<sub>2</sub>/l·h. De forma significativa, se observa un valor elevado de esta variable en la muestra ML41 (53,0 mgO<sub>2</sub>/l·h) (Tabla 30). Este valor fue causado por una elevada OUR<sub>end.A</sub> (35,0 mgO<sub>2</sub>/l·h). Este valor se debe probablemente a un error experimental, ya que supera incluso al valor determinado para la correspondiente Rs, por tanto no ha sido tenido en cuenta para el cálculo de los promedios, ni para el análisis estadístico. OUR<sub>end.A</sub> presentó un valor promedio de 5,94 mgO<sub>2</sub>/l·h durante el periodo estudiado, el cual varió en un rango de 0-19,19 mgO<sub>2</sub>/l·h. La OUR<sub>end.H</sub> presentó un valor promedio de 14,0 mgO<sub>2</sub>/l·h, el cual varió en un rango de 3,9-24,0 mgO<sub>2</sub>/l·h.

Tabla 30. Media (M), desviación estándar (DE), valor máximo (Mx) y valor mínimo (Mn) de las tasas de respiración medidas en la EDAR ML

Tasa de respiración	M	DE	Mx	Mn
OUR <sub>end.max</sub> (mgO <sub>2</sub> /l·h)	32,73	12,60	19,81	5,00
SOUR <sub>end.max</sub> (mgO <sub>2</sub> /gSSVLM·h)	6,62	2,31	3,91	1,06
OUR <sub>end.H</sub> (mgO <sub>2</sub> /l·h)	23,53	8,13	13,88	3,87
SOUR <sub>H</sub> (mgO <sub>2</sub> /gSSVLM·h)	5,63	1,52	2,74	0,86
OUR <sub>end.A</sub> (mgO <sub>2</sub> /l·h)	19,19	0,00	5,94	3,84
SOUR <sub>A</sub> (mgO <sub>2</sub> /gSSVLM·h)	4,15	0,00	1,17	0,80
(mgO <sub>2</sub> /gSSVLM·h)	53,30	1,39	23,97	11,76
R <sub>smáx</sub> (mgO <sub>2</sub> /l·h)	22,27	0,67	9,50	5,10
AUR (mgNH <sub>4</sub> /l·h)	11,66	0,30	5,25	2,57
AUR <sub>p</sub> (mgNH <sub>4</sub> /gSSVLM·h)	4,87	0,15	2,08	1,12

OUR<sub>end.max</sub>, tasa de respiración endógena de la biomasa heterótrofa y autótrofa; SOUR<sub>end.max</sub>, tasa de respiración endógena específica de la biomasa heterótrofa y autótrofa; OUR<sub>end.H</sub>, tasa de respiración endógena de la biomasa heterótrofa; SOUR<sub>H</sub>, tasa de respiración endógena específica de la biomasa heterótrofa; OUR<sub>end.A</sub>, tasa de respiración endógena de la biomasa autótrofa; SOUR<sub>A</sub>, tasa de respiración endógena específica de la biomasa autótrofa; Rs, tasa de respiración máxima por nitrificación. R<sub>sp</sub>, tasa de respiración máxima específica por nitrificación. AUR, tasa de nitrificación; AUR<sub>p</sub>, tasa específica de nitrificación.

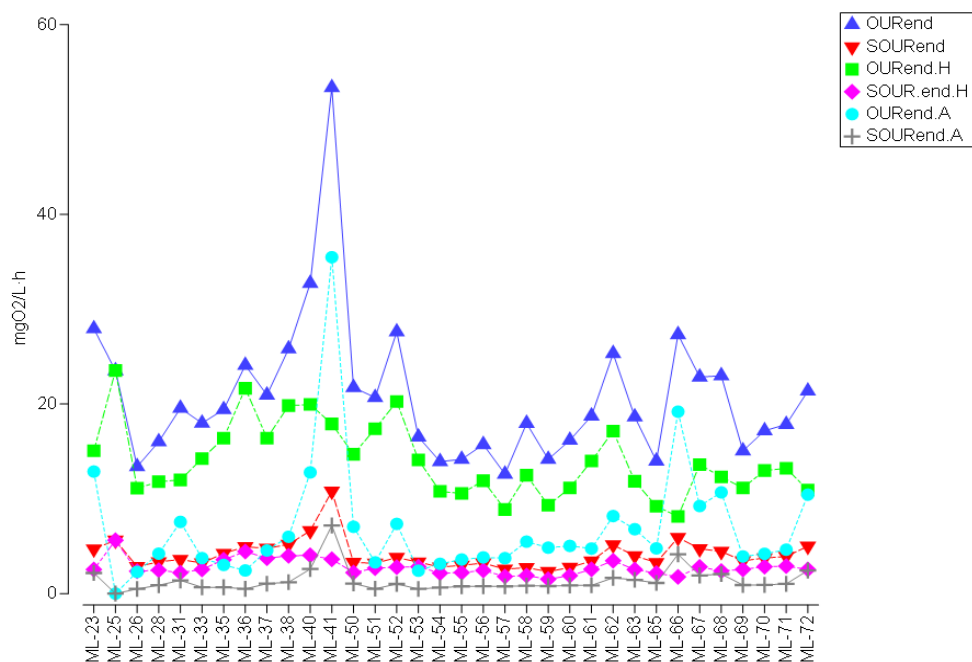


Figura 73. Evolución temporal de las tasas de respiración endógena en el fango activo de la EDAR ML

En la Figura 74 se representan la  $OUR_{endA}$  y  $R_s$ , entre ellas no se observa una relación directa aparente. La tasa de respiración máxima por nitrificación presentó un valor promedio de  $24,1 \text{ mgO}_2/\text{l h}$  el cual varió en un rango de  $1,0\text{-}53,0 \text{ mgO}_2/\text{l h}$ . Los valores más elevados de este parámetro se observaron en las muestras ML55, ML65 y ML66. Los valores más bajos de esta variable se correspondieron con las muestras ML23, ML25 y ML72. Los valores de AUR variaron entre  $0,3$  y  $11,66 \text{ mgN}/\text{L h}$ , su valor promedio fue de  $5,25 \text{ mgN}/\text{L h}$ .

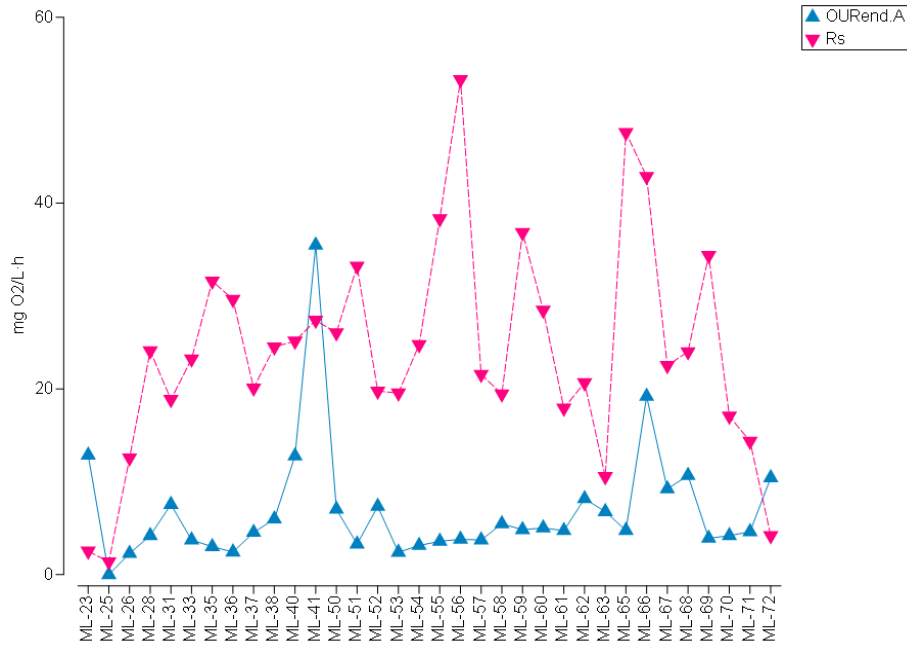


Figura 74. Evolución temporal de la tasa de respiración endógena de las bacterias autótrofas ( $OUR_{end.A}$ ) y la tasa de respiración máxima por nitrificación ( $R_s$ ) en el fango activo de la EDAR ML.

En la Figura 75 se representan  $SOUR_{end.A}$  y  $R_{sp}$  en cada una de las muestras analizadas. Estas variables representan las tasas específicas de respiración endógena y exógena de la biomasa nitrificante, respectivamente. En este caso tampoco se observa una relación directa aparente. La tasa de respiración máxima específica por nitrificación presentó un valor promedio de  $9,5 \text{ mgO}_2/\text{l h}$  el cual varió en un rango de  $22,27-0,67 \text{ mgO}_2/\text{l h}$ . Los valores más elevados de este parámetro se observaron, al igual que en el caso anterior, en las muestras ML55, ML65 y ML66. Del mismo modo, los valores más bajos se correspondieron con las muestras ML23, ML25 y ML72.



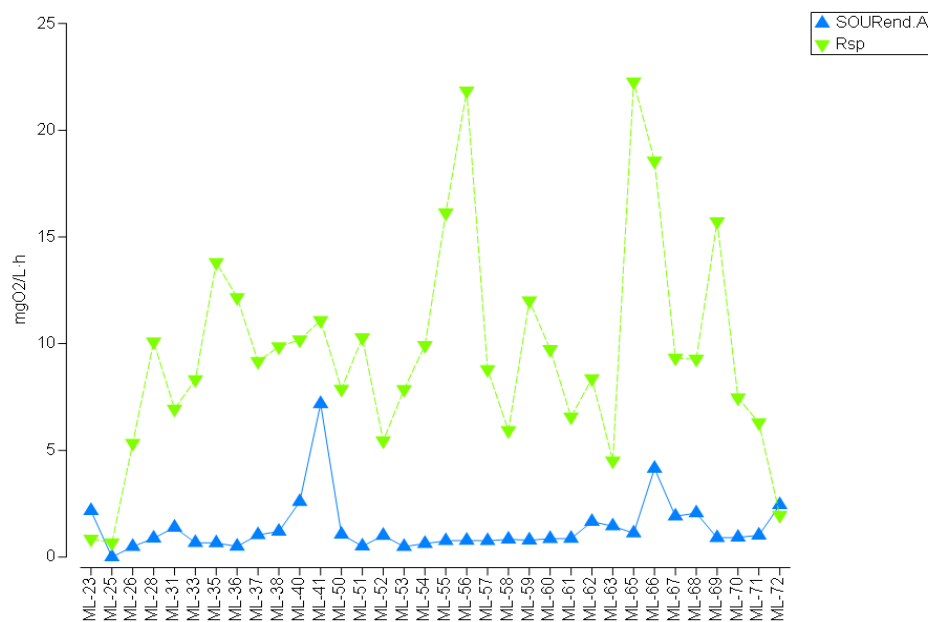


Figura 75. Evolución temporal de la tasa específica de respiración endógena de las bacterias autótrofas (SOUR<sub>end.A</sub>) y la tasa específica de respiración máxima por nitrificación (R<sub>sp</sub>) en el fango activo de la EDAR ML

#### 4.3.2 Interpretación ambiental de la actividad nitrificante

Con el objetivo de evaluar posibles factores que expliquen la actividad de la biomasa nitrificante en los sistemas de fangos activos se construyeron dos modelos lineales de regresión multivariante: uno con los resultados de las abundancias relativas obtenidas por FISH y otro con las variables ambientales. La construcción de los modelos se ha basado en el uso de los criterios y procedimientos más parsimoniosos (*step-wise/AICc*).

El análisis DISTLM se utilizó para evaluar, en las 34 muestras analizadas, las relaciones entre las variables ambientales y las variables respirométricas. El modelo lineal multivariante seleccionado estableció que el 44,66% de la variación en la abundancia de las variables respirométricas fue atribuida a T<sup>a</sup>r, %SSVLM, DQOs y CPTs. Los resultados del test secuencial del modelo indican que la T<sup>a</sup>r contribuyó con el mayor porcentaje de variación (20,4% respecto al total de la variación explicada), mientras que el %SSVLM, DQOs y CPTs contribuyeron con el 10,37%, 7,79% y 6,10%, respectivamente.

Tabla 31. Resultados del test secuencial para el análisis DISTLM realizado entre las variables ambientales y las variables respirométricas en la EDAR ML.

Variable	Test secuencial			
	AICc	Pseudo-F	P	Prop
T <sup>a</sup> r	66	8,20	0,001	20,40
%SSVLM	63	4,64	0,004	10,36
DQOs	62	3,80	0,012	7,79
CPTs	61	3,19	0,033	6,10
Variación total explicada				44,66

T<sup>a</sup>r, temperatura en el reactor biológico; CPTs, concentración de fósforo total soluble; %SSVLM, porcentaje de sólidos suspendidos del licor mezcla; DQOs, DQO soluble.

Los resultados del modelo fueron visualizados usando un dbRDA (Figura 76). Con el objetivo de detectar qué variables mostraron las mejores correlaciones con el conjunto de variables ambientales, los coeficientes de correlación de Pearson fueron superpuestos en el modelo como vectores. El 31,55% de la variación fue explicado por el eje de ordenación 1 (Tabla 32); la tasa de respiración endógena global y la tasa de respiración endógena de la biomasa heterótrofa, y sus correspondientes tasas específicas, mostraron coeficientes de correlación significativos elevados con este eje, ( $r > 0,7$ ). Éstos resultados relacionan positivamente estas variables con la T<sup>a</sup>r; las mayores tasas de respiración endógena global y heterótrofa se asociaron con temperaturas mayores de 23 °C.

Tabla 32. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables ambientales y correlaciones de las variables respirométricas con los ejes del dbRDA en la EDAR ML

	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3	dbRDA4
% variación explicada	31,55	10,14	2,4	0,58
Variable	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3	dbRDA4
T <sup>a</sup> r	-0,789	-0,366	0,384	0,311
%SSVLM	0,523	-0,592	0,603	-0,144
DQOs	-0,323	-0,021	0,081	-0,943
CPTs	-0,093	-0,718	-0,695	-0,037
OURend.max	-0,719	-0,147	0,101	-0,086
SOURend.max	-0,734	-0,192	-0,165	0,029
OURend.H	-0,709	0,092	0,302	0,011
SOURH	-0,716	0,045	-0,033	0,148
OURend.A	-0,269	-0,368	-0,032	-0,076
SOURA	-0,273	-0,411	-0,131	-0,031
Rsp	0,402	-0,131	0,205	0,024
Rs	0,377	-0,031	0,036	0,091

OURend.max, tasa de respiración endógena de la biomasa heterótrofa y autótrofa; SOURend.max, tasa de respiración endógena específica de la biomasa heterótrofa y autótrofa; OURend.H, tasa de respiración endógena de la biomasa heterótrofa; SOURendH, tasa de respiración endógena específica de la biomasa heterótrofa; OURend.A, tasa de respiración endógena de la biomasa autótrofa; SOURA, tasa de respiración endógena específica de la biomasa autótrofa; Rs, tasa de respiración máxima por nitrificación. Rsp, tasa de respiración máxima específica por nitrificación. %N-NO<sub>2</sub>, porcentaje de nitrito respecto al nitrógeno total en el efluente. T<sup>a</sup>r, temperatura en el reactor biológico; CPTs, concentración de fósforo total soluble; %SSVLM, porcentaje de sólidos suspendidos del licor mezcla; DQOs, DQO soluble.

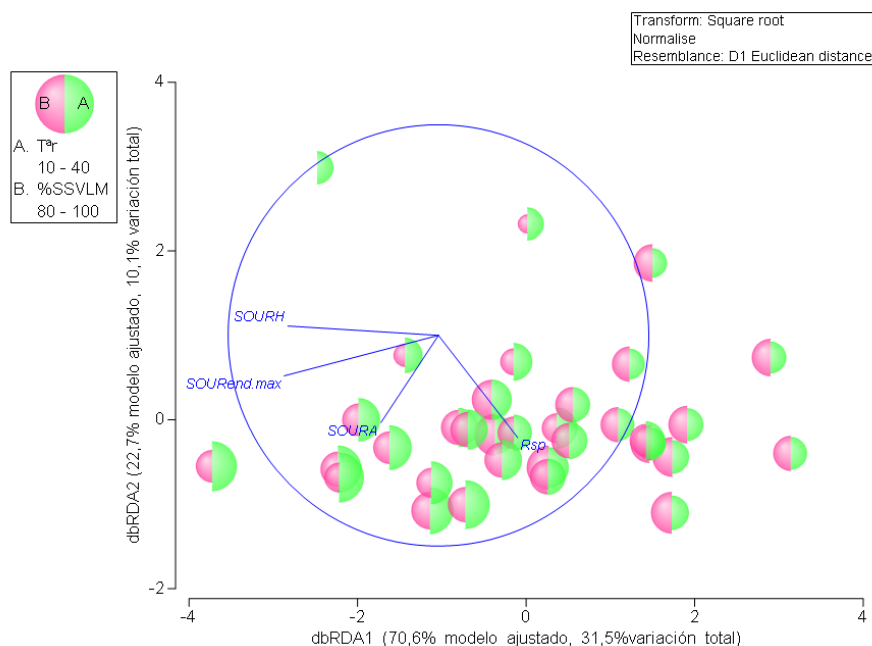


Figura 76. Gráfico de burbujas de la temperatura en el reactor ( $T^{\circ}r$ ) y el porcentaje de sólidos suspendidos volátiles (%SSVLM) en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las variables ambientales y respirométricas en la EDAR ML.

Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson de las variables biológicas mayores de 0,40 y -0,40. SOURendH, tasa de respiración endógena específica de la biomasa heterótrofa; SOURend.max, tasa de respiración endógena específica de la biomasa heterótrofa y autótrofa; SOURA, tasa de respiración endógena específica de la biomasa autótrofa; Rsp, tasa de respiración máxima específica por nitrificación.

El eje 2 del dbRDA explicó un 10,14% de la variación total observada. Este eje mostró una correlación negativa elevada con la CPTs ( $r=-0,718$ ) y moderada con %SSVLM ( $r=-0,592$ ). La SOURend.A ( $r=-0,411$ ) mostraron coeficientes de correlación significativos con este eje. Según el dbRDA estos parámetros presentaron valores más elevados para CPTs mayores de 1 mgP/L y %SSVLM del 85%.

El segundo DISTLM construido se utilizó para buscar relaciones entre las variables respirométricas y las variables biológicas determinadas por FISH en las muestras de fago activo de la EDAR ML. El modelo lineal multivariante seleccionado estableció que el 26,02% de la variación en la abundancia de las BN se relacionó con  $OUR_{end.H}$  y  $Rs$  (Tabla 33). Los resultados del test secuencial del modelo indican que la  $OUR_{end.H}$  contribuyó con porcentaje de variación del 16,45% respecto al total de la variación explicada, mientras que  $Rs$  contribuyó con un 9,57%.

Tabla 33. Resultados del test secuencial para el análisis DISTLM realizado entre las variables respirométricas y bacterias nitrificantes en la EDAR ML.

Variable	AICc	Test secuencial		
		Pseudo-F	P	Prop
OUR end.H	225	6,29	0,004	16,51
Rs	223	4,01	0,007	9,61
Variación total explicada				26,12

OUR<sub>end.H</sub>, tasa de respiración endógena de la biomasa heterótrofa; Rs, tasa de respiración máxima por nitrificación.

Los resultados del modelo fueron visualizados usando un dbRDA (Figura 77). El 20,08% de la variación fue explicado por el eje de ordenación 1 (Tabla 34); las variables biológicas relacionadas con este eje fueron los géneros *Nitrosomonas* ( $r=0,628$ ) y *Nitrotoga* ( $r=0,448$ ). OUR<sub>end.H</sub> se relacionó negativamente con este eje.

Tabla 34. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables respirométricas y correlaciones de las variables biológicas con los ejes del dbRDA en la EDAR ML

	dbRDA1	dbRDA2
% variación explicada	20,08	5,95
Variable	dbRDA1	dbRDA2
OUR END.H	-0,775	0,632
Rs	0,632	0,775
Nso	0,628	0,078
Nsoo	0,309	-0,176
Nsoe	-0,160	-0,081
Ntspa	-0,351	-0,356
Ntoga	0,445	-0,264
Ntb	0,000	0,000

OUR<sub>end.H</sub>, tasa de respiración endógena de la biomasa heterótrofa; Rs, tasa de respiración máxima por nitrificación; Nso, *Nitrosomonas* spp.; Nsoo, *Nitrosomonas oligotropha*; Nsoe, *Nitrosomonas halotolerantes*; Ntoga, *Nitrotoga* sp.; Ntspa, *Nitrospira* spp.; Ntb, *Nitrobacter* sp.

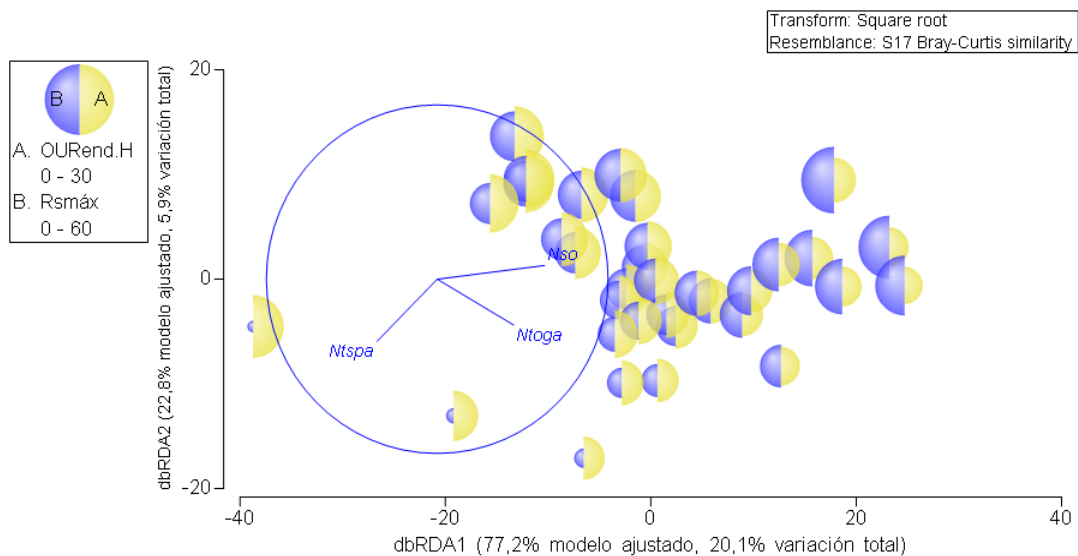


Figura 77. Gráfico de burbujas de la  $OUR_{end,H}$  y la  $R_{smáx}$  en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las variables respirométricas y biológicas en la EDAR ML. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson de las variables biológicas mayores de 0,40 y -0,40. Nso, *Nitrosomonas* spp.; Ntoga, *Nitrotoga* sp.; Ntspa, *Nitrospira* spp.

El eje 2 del dbRDA explicó un 5,95% de la variación total observada; en este caso ninguna de las variables biológicas mostró coeficientes de correlación significativos con este eje de ordenación.

#### 4.4 APLICACIÓN DE TÉCNICAS METAGENÓMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMUNIDADES BACTERIANAS EN SISTEMAS DE FANGOS ACTIVOS

La metagenómica de secuenciación dirigida del gen 16S rRNA fue utilizada para caracterizar y cuantificar el microbioma de las muestras de fango activo en la EDAR ML. En el siguiente apartado se presentan los resultados de la abundancia relativa de las comunidades bacterianas presentes en estas muestras, haciendo uso de dos plataformas de secuenciación diferentes Illumina y PacBio y, prestando especial atención a las comunidades de bacterias nitrificantes.

#### 4.4.1 Resultados de la secuenciación dirigida del gen 16S rRNA de segunda generación haciendo uso de la plataforma Illumina

De las 76 muestras recogidas en la EDAR ML, se analizó el microbioma asociado a 24 de ellas mediante SSG Illumina, con el objetivo de contrastar los resultados obtenidos con la técnica FISH y descubrir posibles sesgos de esta técnica.

Tras el procesado bioinformático de los resultados de la secuenciación se obtuvieron un total de 1454617 secuencias. Tras eliminar las secuencias de baja calidad y las potencialmente quiméricas resultaron 1300162 secuencias. Estas secuencias, tras su agrupación, dieron lugar a 13167 OTUs. El 3,98% de las OTUs no pudieron ser clasificadas.

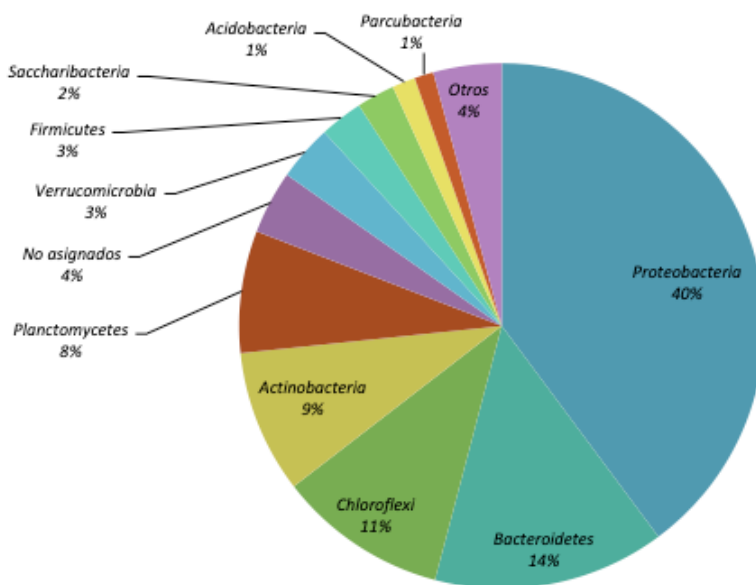


Figura 78. Valor promedio de la distribución por filo en las muestras de fango activo de la EDAR ML según Illumina.

La diversidad bacteriana encontrada en el fango activo de las muestras de ML se muestra en la Figura 78. Los filos bacterianos más abundantes en el promedio de las muestras de fango activo fueron *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Actinobacteria*, *Pantomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Saccharibacteria*, *Acidobacteria* y *Parcubacteria*, que suponen el 91,87 % de la abundancia relativa de las muestras.

En la Figura 79 se representan las abundancias relativas de cada uno de estos filos en las muestras analizadas. El filo *Proteobacteria*, al cual pertenecen la totalidad de BOA y algunas BON, resultó el más abundante en los 24 muestreos analizados mediante Illumina, con abundancias relativas superiores al 34%. Los filos *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Actinobacteria* y *Planctomycetes* presentaron abundancias relativas superiores al 5%. Como se observa en la Figura 79, las muestras presentaron una composición similar a nivel de filo.

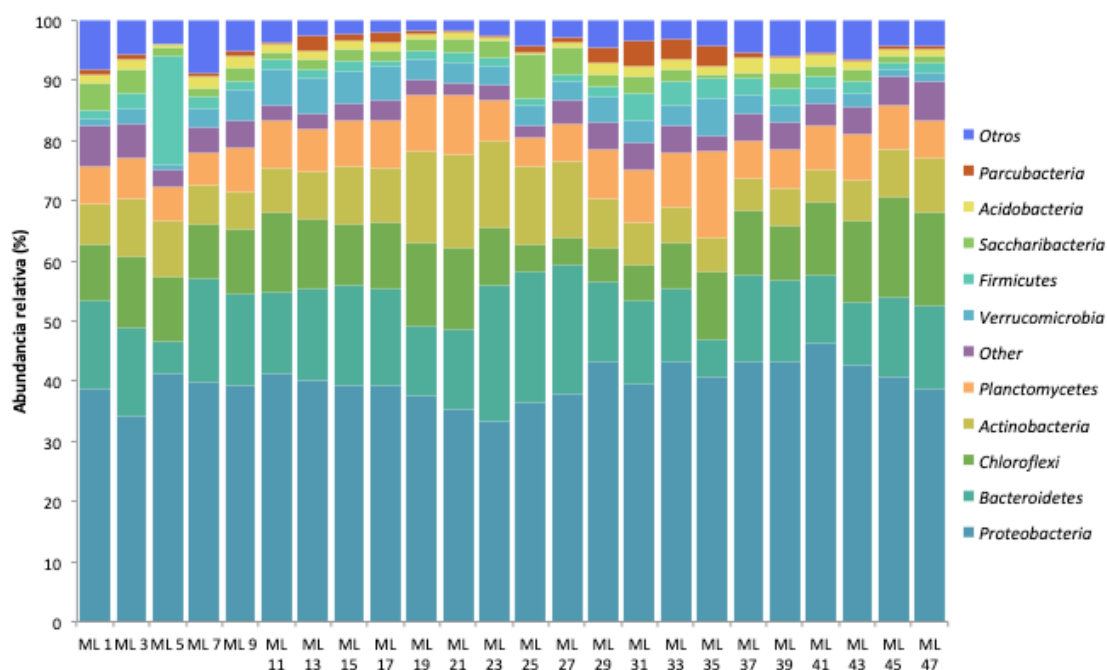


Figura 79. Distribución por filo de las bacterias presentes en cada una de las muestras de fango de la EDAR ML según Illumina.

El filo *Nitrospirae* tuvo una abundancia relativa promedio del 0,13 %. Se detectaron bacterias pertenecientes a este filo en todas las muestras exceptuando ML41 y ML47.

Las clases de bacterias más abundantes en el promedio de las muestras de agua residual fueron *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Sphingobacteriia*, *Alfaproteobacteria*, *Caldilineae*, *Actinobacteria*, *Planctomycetacia*, *Deltaproteobacteria*, *Flavobacteriia*, *Acidimicrobiia*, *Verrucomicrobiae*, *Clostridia*, *Anaerolineae*, OM190, *Cytophagia*, *Thermomicrobia* y *Bacilli*, las cuales representaron el 81,84% de la abundancia relativa del promedio de las muestras (Figura 80). El 5,73% de las OTUs no fue asignado a ninguna clase.

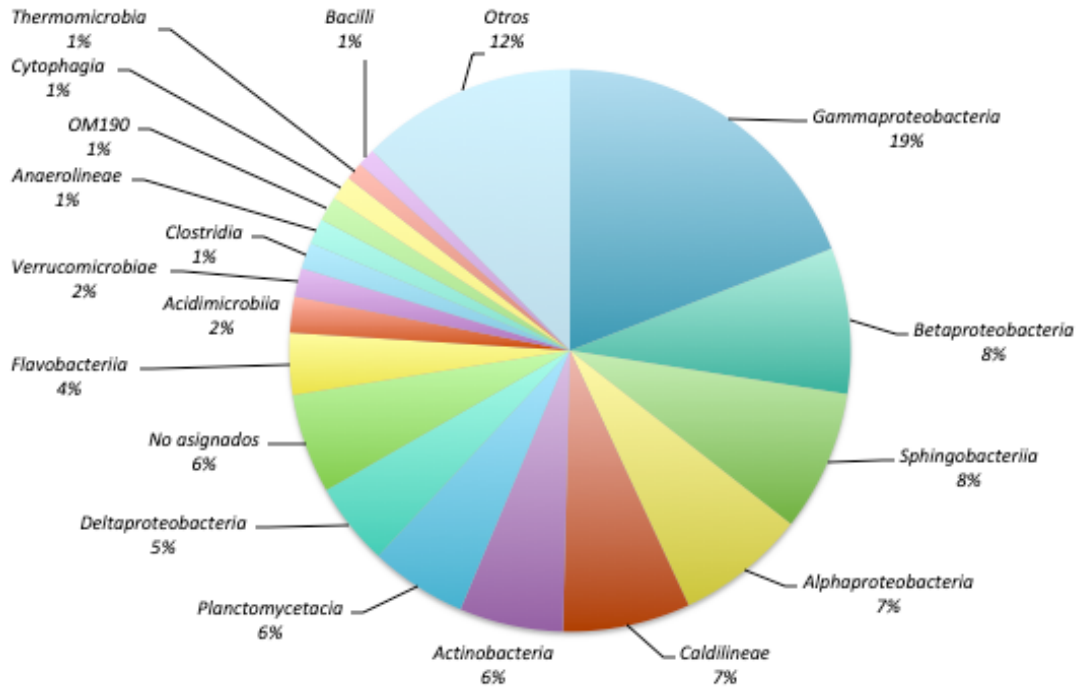


Figura 80. Valor promedio de la distribución por clase en las muestras de fango de la EDAR ML según Illumina.

Al igual que sucedía en el caso anterior la distribución de la abundancia relativa a nivel de clases bacterianas muestra una distribución similar en las muestras (Figura 81). Las clases *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* y *Alphaproteobacteria* estuvieron presentes en todas las muestras.

Todas las OTUs asignadas taxonómicamente al filo *Nitrospirae* se asignaron a la clase *Nitrospira*, con una abundancia relativa promedio del 0,12%.



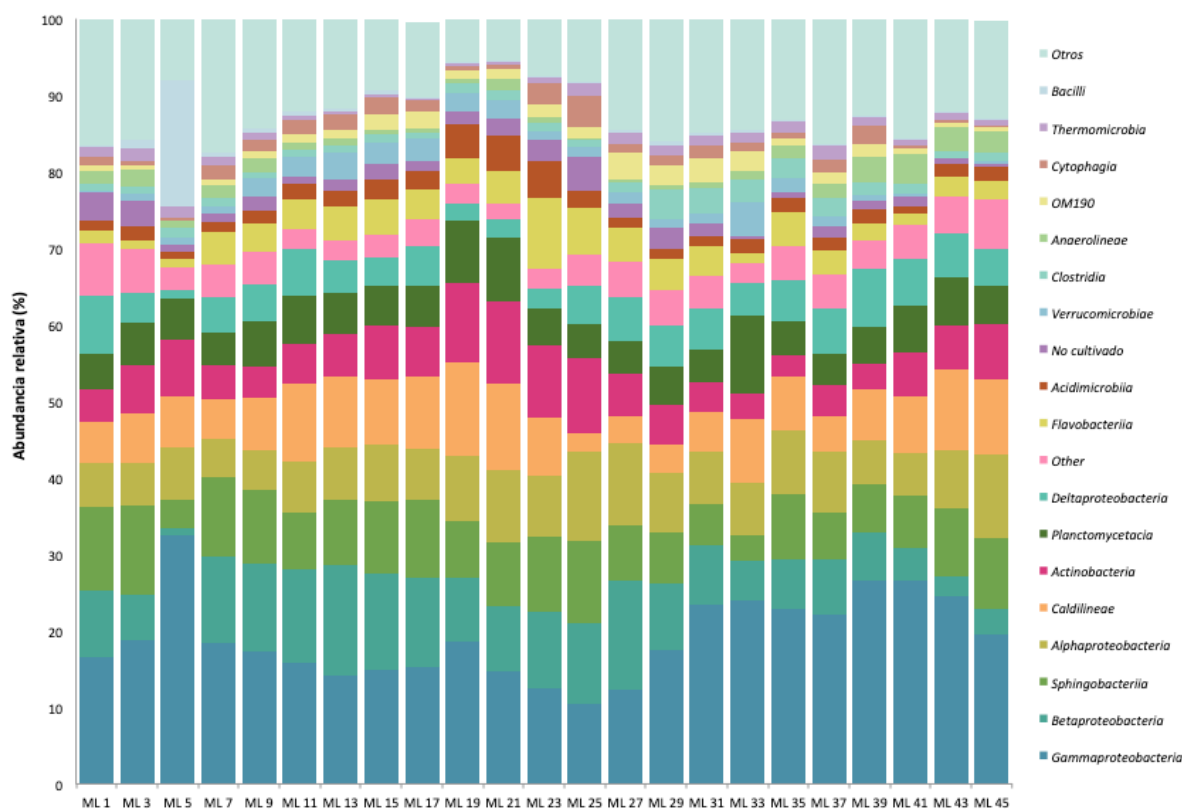


Figura 81. Distribución de las abundancias relativas a nivel de clase en cada una de las muestras de fango de la EDAR ML a partir de los resultados obtenidos con Illumina.

Los géneros de bacterias más abundantes en el promedio de las muestras fueron *Candidatus Competibacter*, *Planctomyces*, *Zoogloea*, *Defluviicoccus* y *Candidatus Microthrix*, estos géneros representaron el 20,02% de la abundancia relativa. El 27,95% de las OTUs a nivel de género no pudieron ser asignados a ningún género bacteriano (Figura 82).

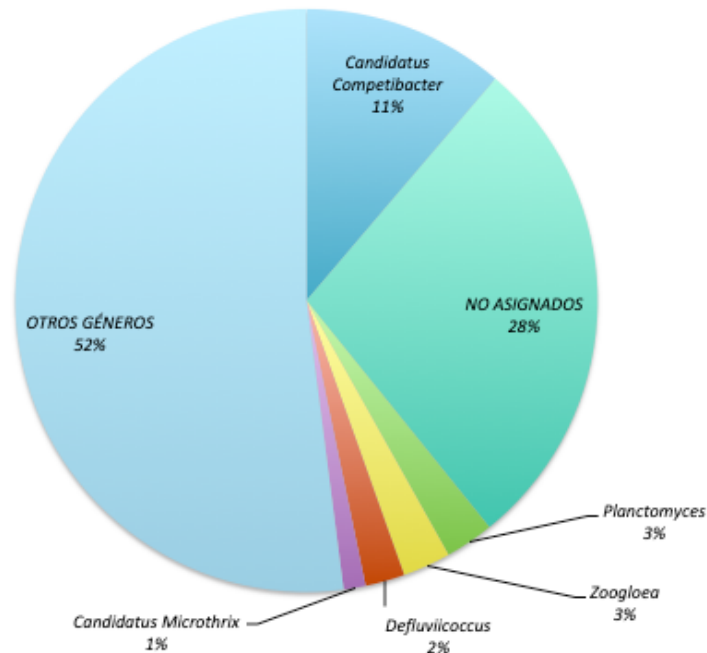


Figura 82. Valor promedio de la distribución por género en las muestras de fango de la EDAR ML a partir de los datos obtenidos con Illumina.

La secuenciación mediante la plataforma Illumina permitió la identificación de diferentes géneros de bacterias nitrificantes. Las OTUs de BOA detectadas se asignaron a los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrospira*, ambos géneros pertenecen a la familia *Nitrosomonadacea* y a la clase *Betaproteobacterias*. El género *Nitrosomonas* presentó abundancias relativas del 0,02% al 0,99% (Figura 83) y fue detectado en el 100% de las muestras analizadas con Illumina. El género *Nitrospira* presentó unas abundancias relativas entre el 0,005% y 0,0136% en tres de las muestras analizadas, que representa un 12,5% de las muestras analizadas con Illumina. Se han detectado en un porcentaje bajo del 0,005% (ML35) de bacterias anammox, *Candidatus 'Anammoximicrobium'*, del filo Planctomycetes, que son capaces de producir la oxidación anaerobia del ión amonio.

Dentro del grupo de las BON la abundancia relativa más alta ha correspondido al género *Nitrospira* con el valor más alto en el muestreo ML1 (0,62%) (Tabla 35). Este género fue detectado en 100% de las muestras analizadas con Illumina y su abundancia relativa promedio fue del 0,151%. La abundancia relativa promedio de *Nitrotoga* respecto al total de bacterias fue del 0,069%, su valor más elevado fue observado en el muestreo

ML35 (0,19%). Este género fue detectados en el 87,5% de las muestras analizadas con Illumina.

Tabla 35. Media (M), desviación estándar (DE), valor máximo (Mx) y valor mínimo (Mn) de la abundancia relativa (%) de bacterias nitrificantes en la EDAR ML determinada con Illumina

Géneros BN	Plataforma de secuenciación Illumina. EDAR ML			
	M	DE	Mx	Mn
<i>Nitrosomonas</i> spp.	1,093	0,000	0,527	0,283
<i>Nitrospira</i> spp. <i>Candidatus</i>	0,762	0,000	0,126	0,175
<i>Nitrotoga</i>	0,154	0,000	0,059	0,060
<i>Nitrosospira</i> spp.	0,014	0,000	0,001	0,003
<i>Nitrobacter</i> spp.	0,000	0,000	0,000	0,000

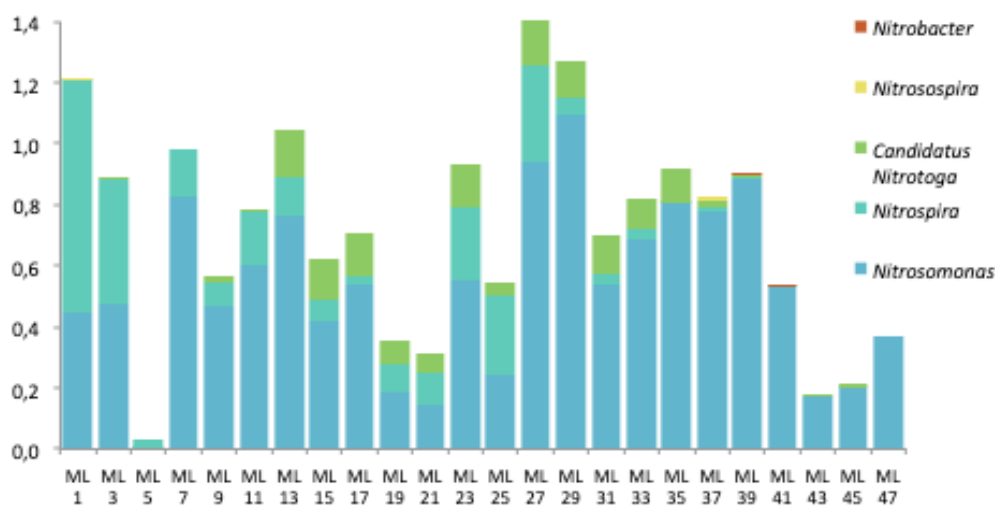


Figura 83. Distribución por género de las bacterias nitrificantes presentes cada una de las muestras de fango de la EDAR ML a partir de los resultados obtenidos con Illumina.

#### 4.4.2 Resultados de la secuenciación dirigida del gen 16S rRNA de tercera generación haciendo uso de la plataforma PacBio

De las 24 muestras analizadas mediante la plataforma de secuenciación Illumina en la EDAR ML, 7 fueron analizadas además con la secuenciación PacBio SMRT. El objetivo de este análisis fue contrastar los resultados obtenidos con la técnica FISH y con la

plataforma Illumina y profundizar en la identificación de los géneros detectados mediante las dos técnicas anteriores.

Tras el procesado bioinformático de los resultados de la secuenciación se obtuvieron un total de 23351 secuencias. Tras eliminar las secuencias de baja calidad y las potencialmente quiméricas resultaron 22520 secuencias. Estas secuencias, tras su agrupación, dieron lugar a 3533 OTUs.

La diversidad encontrada en el fango activo de las muestras de ML se muestra en la Figura 84. Los filos bacterianos más abundantes en el promedio de las muestras del reactor biológico, según la secuenciación con PacBio, ordenados de mayor a menor abundancia relativa fueron: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Nitrospirae*, que representaron el 99,6 % de la abundancia relativa de las muestras. El 0,16% de las OTUs no pudieron ser clasificadas a nivel de filo.

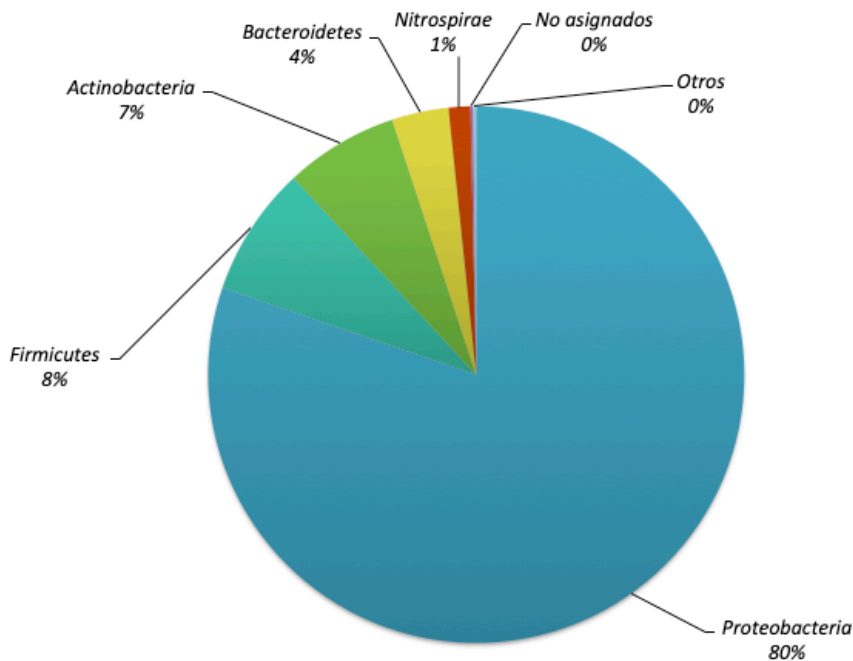


Figura 84. Valor promedio de la distribución por género en las muestras de fango de la EDAR ML a partir de los resultados obtenidos con PacBio.

En la Figura 85 se representan las abundancias relativas de cada uno de estos filos en las muestras analizadas. El filo *Proteobacteria*, al cual pertenecen la totalidad de BOA y algunas BON, resultó el más abundante en los 7 muestreos analizados con PacBio, con

abundancias relativas superiores al 70%. El género *Firmicutes* presentó abundancias relativas entre 3,12% y 14,37%; el filo *Actinobacteria*, presentó abundancias relativas que estuvieron comprendidas entre 1,48% y 15,02. Los filios *Bacteroidetes* y *Nitrospirae* presentaron abundancias relativas que variaron de 0,46% a 4,97% y de 0% a 6,14% respectivamente. El filo *Nitrospirae* fue detectado en todas las muestras exceptuando ML33 y ML51.

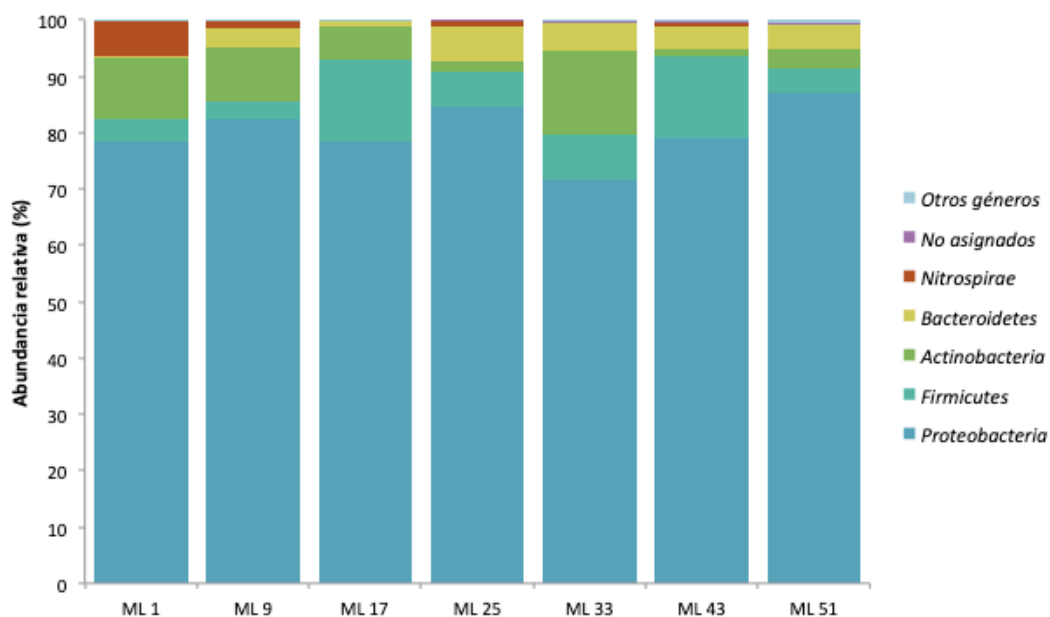


Figura 85. Distribución por filo de las bacterias presentes cada una de las muestras de fango de la EDAR ML a partir de los resultados obtenidos con PacBio.

Los géneros bacterianos más abundantes según la secuenciación PacBio SMRT, fueron *Thauera*, *Zoogloea*, *Rubrivivax*, *Mycobacterium*, *Clostridium*, *Mesorhizobium*, *Variovorax*, *Polynucleobacter*, *Sphingomonas*, *Acidovorax*, *Arcobacter*, *Aquincola*, *Rhodofera*, *Exiguobacterium*, *Ideonella* y *Nitrospira* que cuales representaron el 73% (Figura 86). El 0,41% de las OTUs no pudieron ser clasificadas a nivel de género.

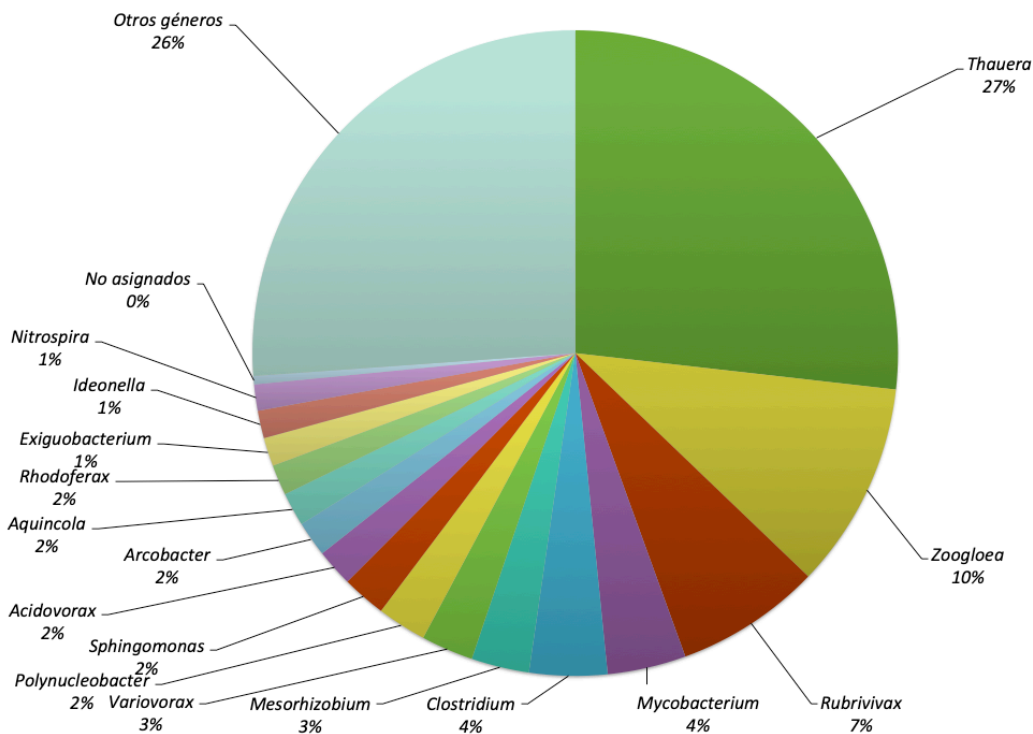


Figura 86. Valor promedio de la distribución por género en las muestras de fango de la EDAR ML a partir de los resultados obtenidos con PacBio.

En la Figura 87 se representan las abundancias relativas de cada uno de estos géneros en las muestras analizadas. El género *Thauera* resultó el más abundante en los 7 muestreos analizados con PacBio, sus abundancias relativas estuvieron comprendidas entre el 47,17% y el 13,37%. La muestra ML1 se caracterizó por la elevada abundancia de este género. El resto de géneros, cuya abundancia relativa se mantuvo por debajo del 20%, presentó una variabilidad marcada. El género *Zoogloea* fue el más abundante en las muestras ML9, ML17 y ML25. La muestra ML33 se caracteriza por presentar una abundancia relativa mayor del género *Mycobacterium*, junto con *Sphingorhabdus* y *Variovorax*. En M43 destacó también la abundancia de los géneros *Rubrivivax* y *Clostridium* y ML51 estuvo caracterizada por presentar una mayor abundancia del género *Polynucleobacter*, el cual superó en abundancia al género *Thauera*. Esta muestra también presentó una abundancia relativa mayor del género *Rubrivivax* al igual que la muestra ML43.

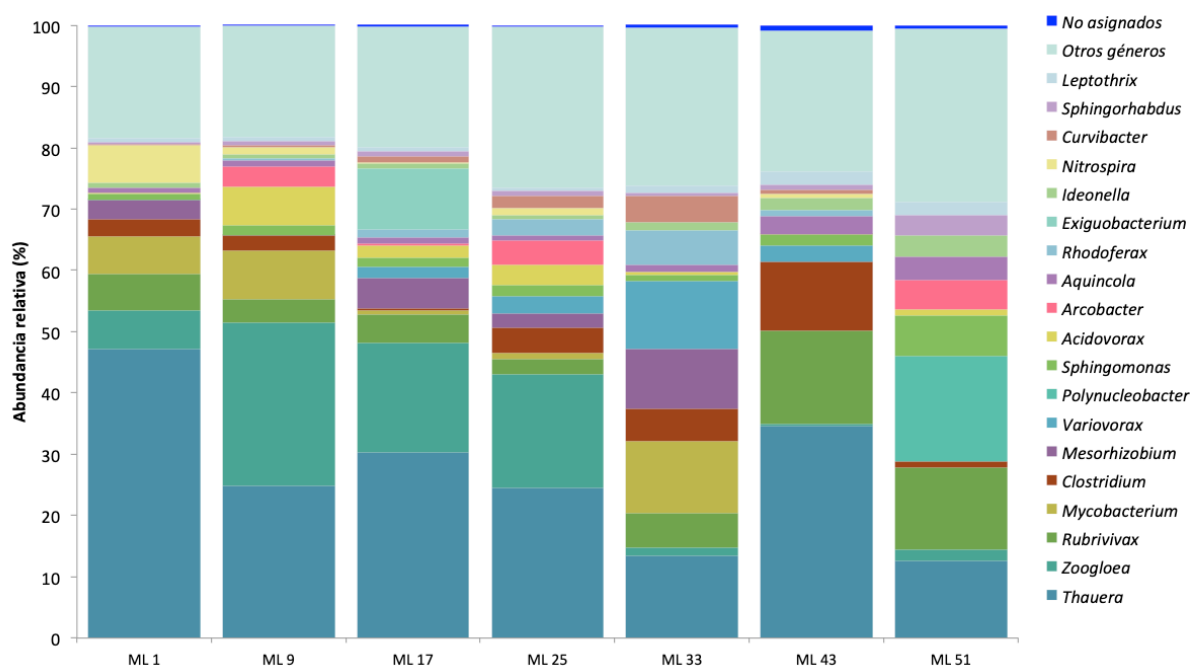


Figura 87. Distribución por género de las bacterias presentes cada una de las muestras de fango de la EDAR ML a partir de los resultados obtenidos con PacBio.

La secuenciación mediante la plataforma PacBio permitió la asignación de diferentes géneros de bacterias nitrificantes. Las BOA detectadas pertenecieron al género *Nitrosomonas*, el cual presentó abundancias relativas del 0,1%-0,98% (Figura 88). Este género fue detectado en todos los muestreos y su abundancia relativa promedio fue del 0,404%.

Dentro del grupo de las BON la abundancia relativa más alta correspondió al género *Nitrospira*, que estuvo presente en todas las muestras, excepto en ML33. El rango de abundancias relativas para *Nitrospira* fue entre el 6,1% y 0% y su abundancia promedio fue del 1,313%. La abundancia relativa promedio de *Nitrotoga* fue del 0,070%, su rango estuvo comprendido entre el 0,350% y 0%. Este género fue detectado en todas las muestras exceptuando ML43 y ML51.

Tabla 36. Media (M), desviación estándar (DE), valor máximo (Mx) y valor mínimo (Mn) de la abundancia relativa (%) de bacterias nitrificantes a nivel de género en la EDAR ML determinada con PacBio

Géneros BN	M	DE	Mx	Mn
<i>Nitrosomonas</i> spp.	0,404	0,342	0,980	0,100
<i>Nitrospira</i> spp.	1,313	2,187	6,140	0,000
<i>Candidatus Nitrotoga</i>	0,070	0,130	0,350	0,000

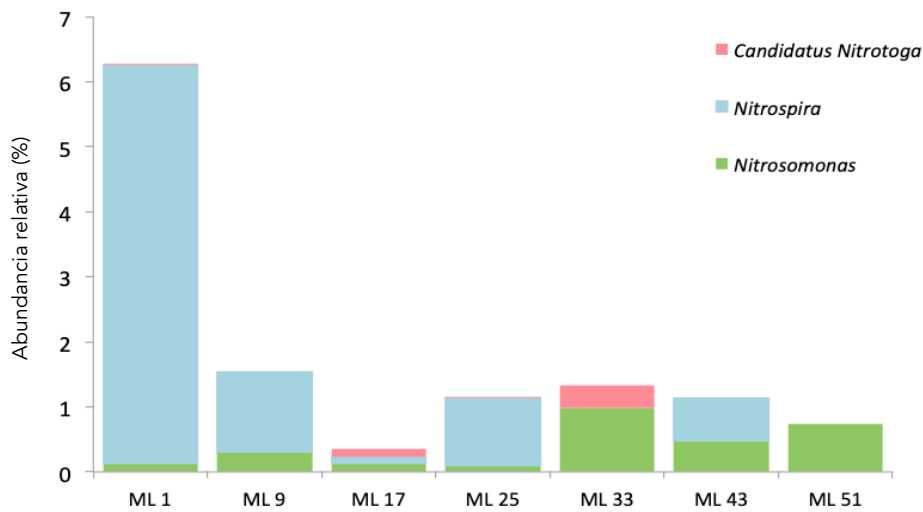


Figura 88. Distribución por género de las bacterias nitrificantes presentes cada una de las muestras de fango de la EDAR ML a partir de los resultados obtenidos con PacBio.

La utilización de la plataforma de secuenciación PacBio permitió a identificación y cuantificación de la población bacteriana de las muestras de fango de la EDAR ML a nivel de especie. Las especies más abundantes fueron *Thauera* sp., *Thauera aromatica*, *Zoogloea* sp., *Rubrivivax gelatinosus*, *Zoogloea caeni*, *Sphingomonas* sp., *Polynucleobacter necessarius*, *Thauera aminoaromatica*, *Thauera chlorobenzoica* y *Rubrivivax gelatinosus* IL144, además de las que se detallan en la Figura 89.

En la Figura 90 se representan las abundancias relativas de cada una de estas especies en las muestras analizadas. La especie *Thauera* sp. resultó la más abundante en los 6 de los 7 muestreos analizados con PacBio (ML1, ML9, ML17, ML25, ML33 y ML43), sus abundancias relativas estuvieron comprendidas entre el 23,93% y el 6,72%. La muestra ML51 se caracterizó por presentar una abundancia relativa mayor de la especie *Polynucleobacter necessarius*. ML43 se caracterizó por presentar mayor abundancia relativa de *Rubrivivax gelatinosus* coexistiendo con *Thauera aromática*. ML33 se caracterizó por presentar la estructura poblacional más diferenciada del resto de muestras. Las muestras ML25, ML17 y ML9 fueron las más similares en cuanto a composición con elevadas abundancias relativas de las especies *Thauera aromática* y *Zoogloea* sp. Del mismo modo ML1 presentó elevadas abundancias de la especie *Thauera aromática*.



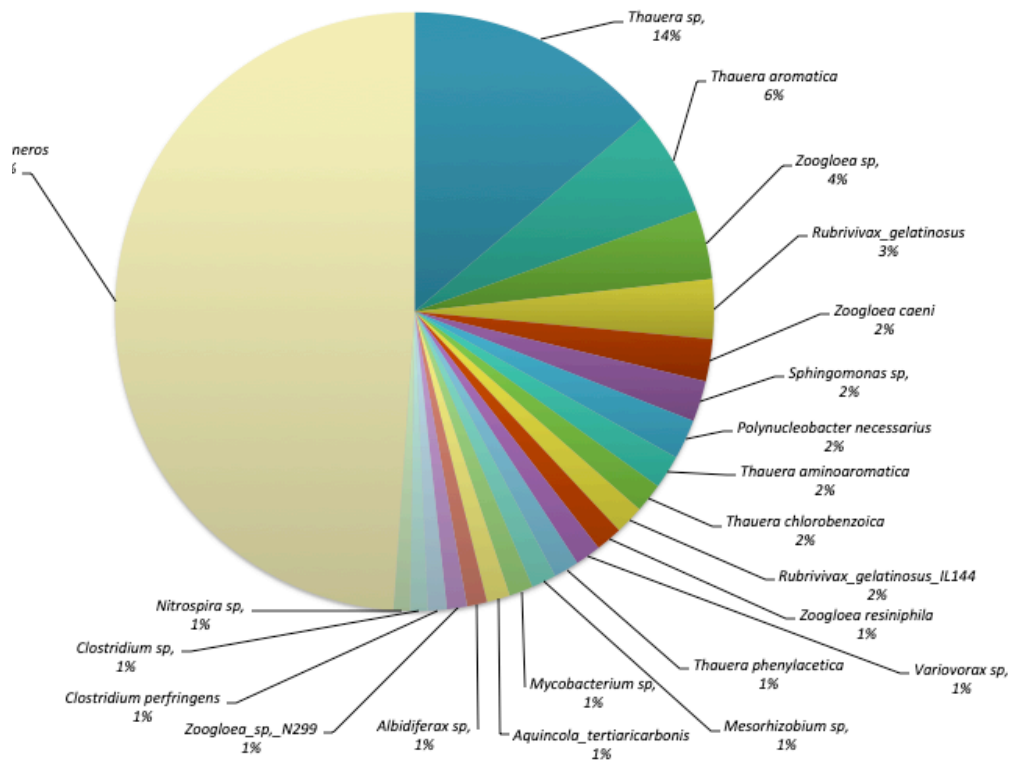


Figura 89. Valor promedio de la distribución por género en las muestras de fango de la EDAR ML a partir de los resultados obtenidos con PacBio.

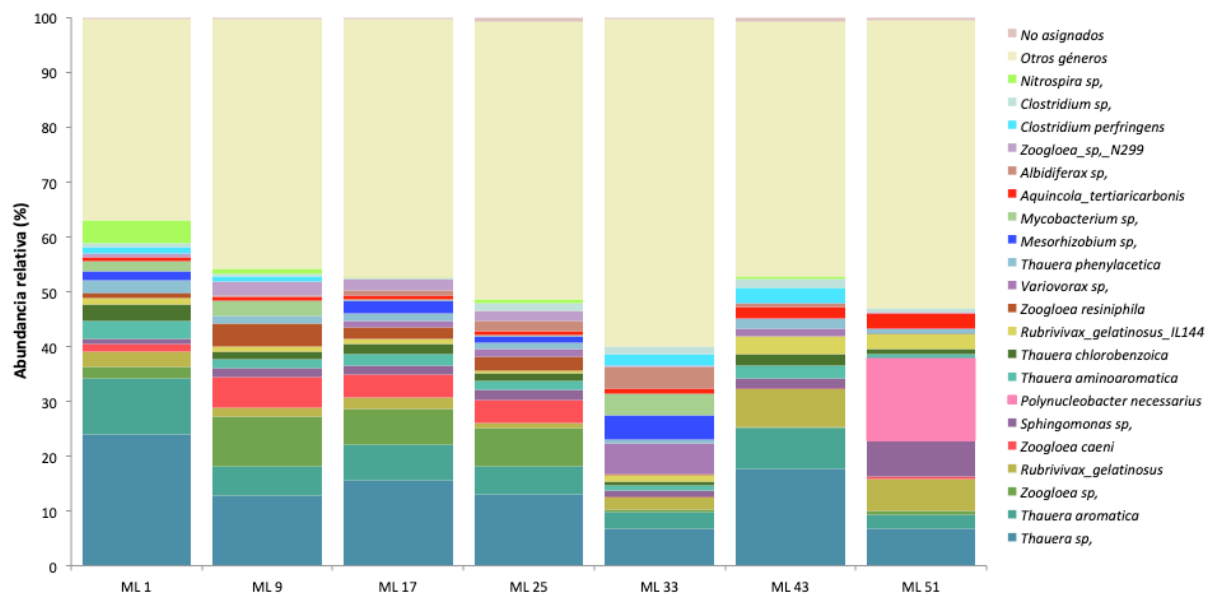


Figura 90. Distribución por clase de las bacterias presentes cada una de las muestras de fango de la EDAR ML a partir de los resultados obtenidos con PacBio.

La secuenciación mediante la plataforma PacBio permitió la identificación de diferentes especies de bacterias nitrificantes. Las BOA identificadas, dentro del género *Nitrosomonas*, se asignaron a las especies *Nitrosomonas marina*, *Nitrosomonas* sp. y *Nitrosomonas aestuarii*. Cada una de estas especies fue detectada en todas las muestras analizadas. *N. aestuarii* fue la especie que presentó mayor abundancia, con un valor promedio del 0,226% y un rango del 0,050%-0,490%. *N. marina* y *Nitrosomonas* sp. presentaron abundancias relativas similares con un promedio de 0,091% y 0,087% respectivamente.

Dentro del grupo de las BON la abundancia relativa más elevada correspondió a la especie *Nitrospira* sp., que estuvo presente en todas las muestras exceptuando ML33 y ML51. El rango de abundancias de *Nitrospira* sp. estuvo comprendido entre el 4,17% y 0% y su abundancia promedio fue del 0,893%. Dentro del género *Nitrospira* también fueron detectadas las especies *Candidatus Nitrospira*, *Candidatus Nitrospira defluvii* y *Nitrospira* cf. *moscoviensis*, con un promedio de abundancias relativas de 0,084%, 0,169% y 0,084% respectivamente (Tabla 37).

*Candidatus Nitrotoga* fue detectada en 4 de las 7 muestras analizadas (ML1, ML17, ML25 y ML33); su abundancia promedio fue del 0,070%, su rango estuvo comprendido entre el 0,350% y 0%.

Tabla 37. Media (M), desviación estándar (DE), valor máximo (Mx) y valor mínimo (Mn) de la abundancia relativa (%) de bacterias nitrificantes a nivel de especie en la EDAR ML determinada con Illumina

<b>Especies BN</b>	<b>M</b>	<b>DE</b>	<b>Mx</b>	<b>Mn</b>
<i>Nitrosomonas marina</i>	0,091	0,090	0,260	0,020
<i>Nitrosomonas</i> sp.	0,087	0,075	0,230	0,020
<i>Nitrosomonas aestuarii</i>	0,226	0,188	0,490	0,050
<i>Candidatus Nitrospira</i>	0,084	0,139	0,390	0,000
<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i>	0,169	0,281	0,790	0,000
<i>Nitrospira</i> sp.	0,893	1,485	4,170	0,000
<i>Nitrospira</i> cf. <i>moscoviensis</i>	0,084	0,139	0,390	0,000
<i>Candidatus Nitrotoga</i>	0,070	0,130	0,350	0,000

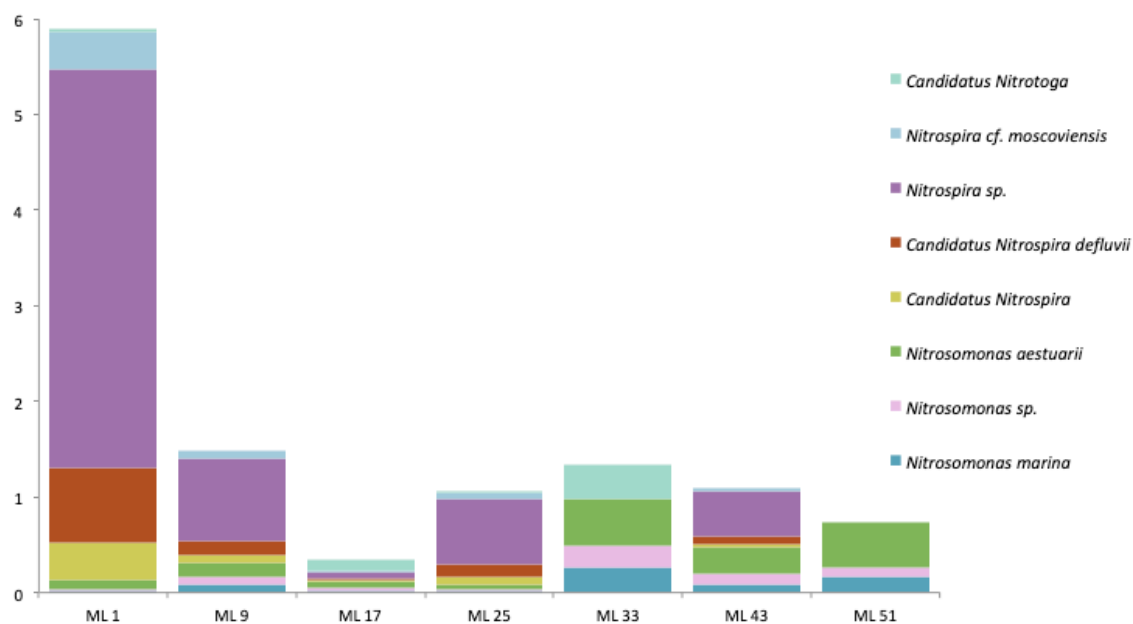


Figura 91. Distribución por especie de las bacterias nitrificantes presentes cada una de las muestras de fango de la EDAR ML a partir de los resultados obtenidos con PacBio.

#### 4.4.3 Modelos de interpretación ambiental

Con el objetivo de determinar las técnicas que presentaron mayores correlaciones con el conjunto de variables ambientales y los rendimientos de eliminación de nitrógeno se construyó un modelo lineal de regresión multivariante con los resultados de las abundancias relativas obtenidas por FISH y la plataforma de secuenciación Illumina. A pesar de que los resultados obtenidos con la plataforma de secuenciación PacBio son más precisos, el número de muestras no fue suficiente para realizar un análisis de interpretación ambiental, por lo que el análisis se ha realizado únicamente con las dos técnicas comentadas anteriormente.

Se construyó un DISTLM respecto a las variables ambientales y las abundancias relativas de las BN en las 24 muestras analizadas con la plataforma de secuenciación Illumina y las mismas muestras analizadas por FISH. La construcción del modelo se ha basado en el uso de criterios y procedimientos más parsimoniosos (*step-wise/AICc*).

El modelo lineal multivariante usado para evaluar las correlaciones entre la población de bacterias nitrificantes y las variables ambientales de la EDAR ML, indicó que

el 41,8% de la variación de las comunidades de bacterias nitrificantes puede ser explicado usando cuatro variables ambientales (Tabla 38). La CN-NH<sub>4</sub> fue la variable que mejor predijo su comportamiento (17,8% de la varianza explicada), seguida la T<sup>a</sup>r, los SSLM y la TRC.

Tabla 38. Resultados del test secuencial para el análisis DISTLM realizado entre las variables ambientales y bacterias nitrificantes en la EDAR ML.

Test secuencial				
Variable	AICc	Pseudo-F	P	Prop
CN-NH <sub>4</sub>	155,54	4,7784	0,002	17,8
T <sup>a</sup> r	153,95	4,0306	0,006	13,2
SSVLM	152,8	3,6799	0,004	10,7
TRC	152,79	2,7514	0,032	7,4
Variación total explicada				41,8

CN-NH<sub>4</sub>, concentración de nitrógeno amoniacal en el afluente al reactor biológico; SSVLM, sólidos suspendidos volátiles del licor mezcla; T<sup>a</sup>, temperatura en el reactor ; TRC, tiempo de retención celular.

Los resultados de abundancia relativa de BOA procedentes de la secuenciación mediante la plataforma Illumina, presentaron coeficientes de correlación más elevados que los procedentes de la técnica molecular FISH (Tabla 39), exceptuando los datos obtenidos de la sonda FISH para el género *Nitrosomonas* (sonda Nso1225<sub>LNA</sub>). Los resultados del modelo fueron visualizados usando un dbRDA (Figura 92). Con el objetivo de detectar que BOA mostraron las mejores correlaciones con el conjunto de variables ambientales, los coeficientes de correlación de Pearson fueron superpuestos en el modelo como vectores.

El 22% de la variación fue explicado por el eje de ordenación 1 (Tabla 39); el género *Nitrotoga* detectado por FISH ( $r=0,634$ ), el género *Nitrotoga* detectado mediante Illumina ( $r=0,692$ ) y el género *Nitrosomonas* detectado por FISH ( $r=-0,544$ ) presentaron coeficientes de correlación significativos con este eje. Éstos resultados relacionan la abundancia de el género *Nitrotoga* con valores bajos de temperatura y de CN-NH<sub>4</sub>. La T<sup>a</sup>r en torno a los 19°C junto con valores de CN-NH<sub>4</sub> entre 7 y 5 mgN/L aparecen correlacionados con abundancias relativas más elevadas de este género.

Tabla 39. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las variables ambientales y correlaciones de las variables biológicas con los ejes del dbRDA en la EDAR ML

	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3	dbRDA4
% variación explicada	22,04	17,64	5,59	3,88
Variable	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3	dbRDA4
CN-NH <sub>4</sub>	-0,658	-0,673	0,311	0,132
T <sup>a</sup> r	-0,618	0,399	-0,166	-0,656
SSVLM	-0,42	0,537	-0,036	0,731
EF	-0,093	-0,316	-0,935	0,133
Nso*	0,248	0,011	0,226	-0,311
Ntspa*	0,259	-0,618	-0,317	-0,102
Ntoga*	0,692	0,059	0,111	0,353
Nts*	-0,211	0,065	0,124	-0,127
Ntb*	0,000	0,000	0,000	0,000
Nso	-0,544	-0,147	0,214	0,198
Nsoo	-0,207	-0,625	0,171	-0,038
Nsoe	0,250	0,156	0,394	0,000
Ntspa	0,147	-0,516	-0,216	0,014
Ntoga	0,634	0,485	-0,191	0,060
Ntb	-0,030	-0,310	0,325	0,256

CN-NH<sub>4</sub>, concentración de nitrógeno amoniacal en el afluente al reactor biológico; SSVLM, sólidos suspendidos volátiles del licor mezcla; CN-NH<sub>4</sub>, concentración de amonio afluente; TRC, tiempo de retención celular. Nso, *Nitrosomonas* spp.; Nsoo, *Nitrosomonas oligotropha*; Ntoga, *Nitrotoga* sp.\*Variables analizadas con Illumina

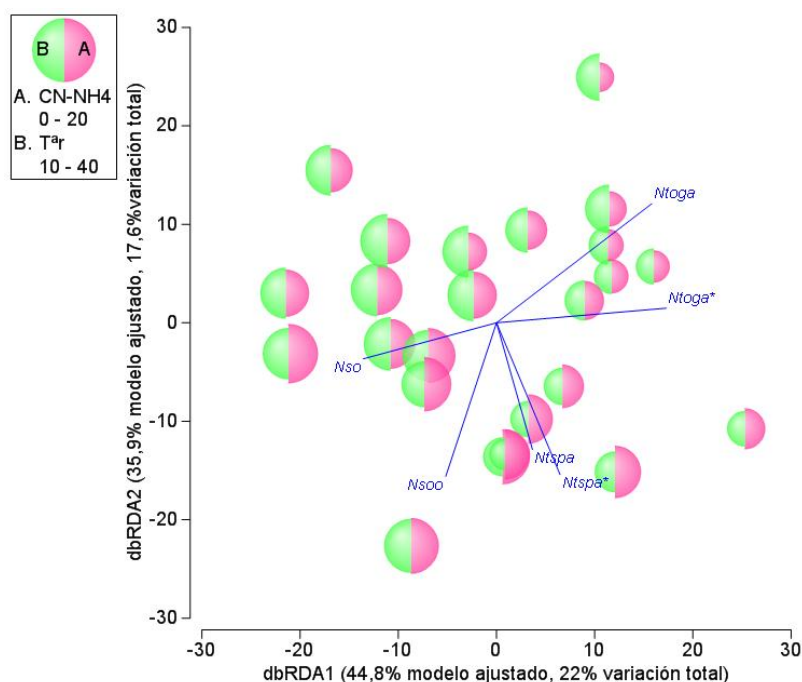


Figura 92. Gráfico de burbujas de la carga de nitrógeno amoniacal y la T<sup>a</sup>r en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre variables ambientales y la abundancia relativa de bacterias nitrificantes en la determinada por FISH y Illumina en la EDAR ML.

Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,40 y -0,40. Nso, *Nitrosomonas* spp.; Nsoo, *Nitrosomonas oligotropha*; Ntoga, *Nitrotoga* sp.; Ntspa, *Nitrospira* spp.

\*Variables analizadas con Illumina

El segundo eje de ordenación explicó un 17,64% de la variación en la comunidad de BN; el género *Nitrospira* detectado tanto por FISH ( $r=-0,516$ ), como a través de la plataforma de secuenciación Illumina ( $r=-0,618$ ) presentó correlaciones significativas con este eje. La especie *N. oligotropha* también estuvo correlacionada con este eje ( $r=-0,625$ ). Éstos resultados indican que su abundancia se relacionó con CN-NH<sub>4</sub> mayores de 10.

Se construyó un segundo nMDS para relacionar las diferentes fracciones de nitrógeno a la salida del decantador secundario y sus respectivos rendimientos de eliminación con las abundancias relativas de las BN en las 24 muestras analizadas con la plataforma de secuenciación Illumina y las mismas muestras analizadas por FISH. La construcción del modelo se basó en el uso de criterios y procedimientos más parsimoniosos (*step-wise/BIC*).

El modelo lineal multivariante usado para evaluar las correlaciones entre la población de bacterias nitrificantes y las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación en la EDAR ML, indicó que el 39,4% de la variación de las comunidades de bacterias nitrificantes puede ser explicado con el rNTs (17,4% de la varianza explicada), rNKTs (12,0% de la varianza explicada) y NTs del efluente (10,0% de la varianza explicada) (Tabla 40).

Tabla 40. Resultados del test secuencial para el análisis DISTLM realizado entre las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación y bacterias nitrificantes en la EDAR ML.

Test secuencial				
Variable	BIC	Pseudo-F	P	Prop
rNTs	157,46	4,63	0,001	17,4
rNKTs	156,86	3,5736	0,01	12,0
NTs	156,38	3,2977	0,013	10,0
Variación total explicada				39,4

rNTs, rendimiento de eliminación del nitrógeno total soluble; rNKTs, rendimiento de eliminación del nitrógeno Kjeldahl soluble; NTs, nitrógeno total soluble.

Los resultados de abundancia relativa procedentes de la técnica molecular FISH presentaron coeficientes de correlación ligeramente más elevados que los procedentes de la secuenciación mediante la plataforma Illumina (Tabla 41). Los resultados del modelo fueron visualizados usando un dbRDA (Figura 94). Con el objetivo de detectar qué variables mostraron las mejores correlaciones con el conjunto de variables ambientales, los coeficientes de correlación de Pearson fueron superpuestos en el modelo como vectores.

El 12,4% de la variación fue explicado por el eje de ordenación 1; el género *Nitrotoga* detectado por FISH ( $r=0,634$ ), el género *Nitrotoga* detectado mediante Illumina ( $r=0,569$ ) y el género *Nitrosomonas* detectado por FISH ( $r=-0,633$ ) presentaron coeficientes de correlación significativos con este eje, al igual que las especies de *Nitrosomonas* halotolerantes detectadas mediante FISH ( $r= 0,433$ ). Estos resultados relacionan la abundancia del género *Nitrotoga* y las *Nitrosomonas* halotolerantes con valores altos de nitrato y valores bajos de NKTs en el efluente. En el dbRDA de la Figura 94 se muestra qué valores de N-NO<sub>3</sub> en el efluente superiores a 6 mg N-NO<sub>3</sub>/L , junto con valores de NKTs en torno a 4 mgN/L, están correlacionados con abundancias relativas más elevadas de este género.

Tabla 41. Coeficientes de correlación múltiple parcial de las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación y correlaciones de las variables biológicas con los ejes del dbRDA en la EDAR ML

	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3
% variación explicada	12,40	9,07	1,28
Variable	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3
rNTs	-0,814	0,477	-0,331
rNKTs	0,094	0,671	0,735
NTs	0,573	0,568	-0,591
Nso*	0,327	0,381	0,223
Ntspa*	-0,022	-0,266	-0,066
Ntoga*	0,569	0,284	0,204
Nts*	-0,117	0,083	0,035
Ntb*	0,000	0,000	0,000
Nso	-0,351	0,437	-0,194
Nsoo	-0,317	0,213	-0,414
Nsoe	0,433	0,419	0,044
Ntspa	0,097	0,086	0,008
Ntoga	0,633	0,256	0,457
Ntb	-0,093	0,105	-0,060

rNTs, rendimiento de eliminación del nitrógeno total soluble; rNKTs; rendimiento de eliminación del nitrógeno Kjeldahl soluble; NTs, nitrógeno total soluble. Nso, *Nitrosomonas* spp.; Nsoo, *Nitrosomonas oligotropha*; Nsoe, *Nitrosomonas halotolerantes*; Ntoga, *Nitrotoga* sp.; Ntspa, *Nitrospira* spp. Ntb, *Nitrobacter* spp.\*Variables analizadas con Illumina

El segundo eje de ordenación explicó un 9,07% de la variación en la comunidad de BN; el género *Nitrosomonas* ( $r=-0,437$ ) y las especies de *Nitrosomonas* halotolerantes ( $r=0,419$ ) detectadas por FISH, mostraron correlaciones significativas con este eje. Éstos resultados indican que su abundancia se relacionó con el rNTs superiores al 70%.

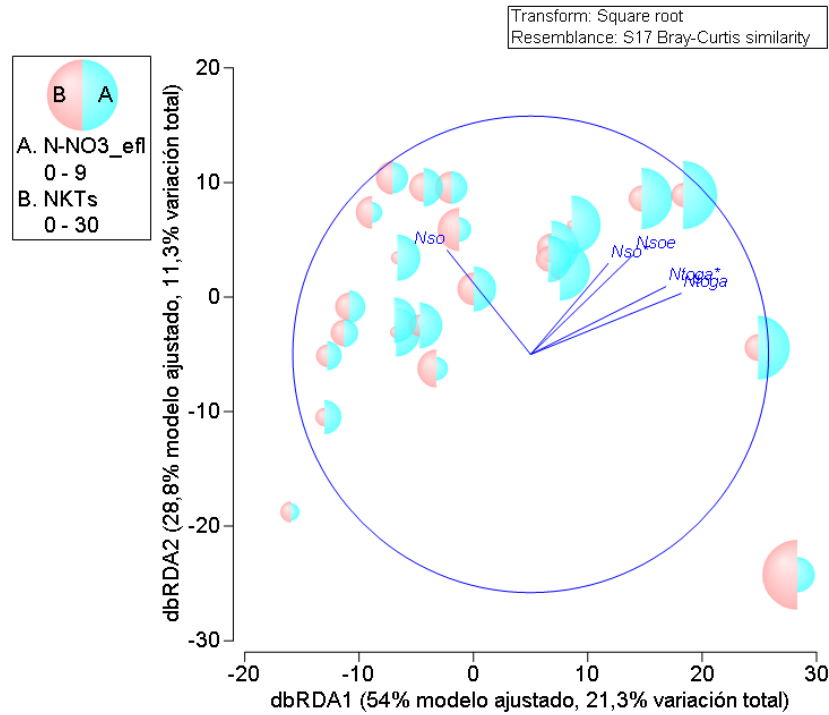


Figura 93. Gráfico de burbujas del nitrato (N-NO3) y el nitrógeno Kjeldhal soluble (NKTs) en el efluente y en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación y la abundancia relativa de bacterias nitrificantes en la determinada por FISH y Illumina en la EDAR ML. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,40 y -0,40. Nso, *Nitrosomonas* spp.; Nsoe, *Nitrosomonas* halotolerantes; Ntoga, *Nitrotoga* sp.\*Variables analizadas con Illumina.

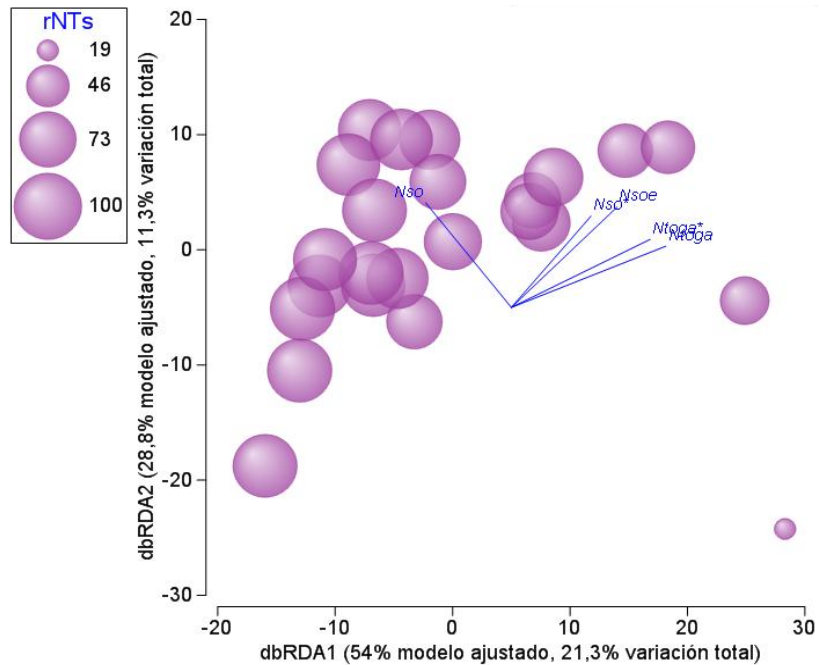


Figura 94. Gráfico de burbujas del rendimiento de eliminación del nitrógeno total soluble (rNTs) en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación y la abundancia relativa de bacterias nitrificantes en la determinada por FISH y Illumina en la EDAR ML. Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,40 y -0,40. Nso, *Nitrosomonas* spp.; Nsoe, *Nitrosomonas* halotolerantes; Ntoga, *Nitrotoga* sp.\*Variables analizadas con Illumina



## 4.5 VALORACIÓN DEL ÍNDICE DE ESTRÉS Y LA CARGA MÁSCICA CALCULADA EN FUNCIÓN DEL ATP

El cálculo del ATPc se realizó a partir de la diferencia entre el ATPt de la muestra y el ATPd. A partir de estos datos se calculó el índice de estrés del sistema (BSI), el cual hace referencia a la diferencia entre material celular vivo y muerto. En la Figura 95 se muestra la evolución de estas variables durante el periodo estudiado. El BSI varió en un rango entre el 3-41%, con una media del 14%. Sus valores mínimos se observaron en las muestras ML3, ML4, M5, ML35 y ML37. Su valor máximo se observó en la muestra ML25.

Tabla 42. Rango y valores promedio de la carga másica y los sólidos activos calculados en función del ATP

	ATPt	ATPc	BSI
	ng/mL	ng/mL	%
Promedio	6550	5614	14
Máximo	13400	11900	41
Mínimo	2690	2460	3

tATP ATP total; cATP, ATP celular

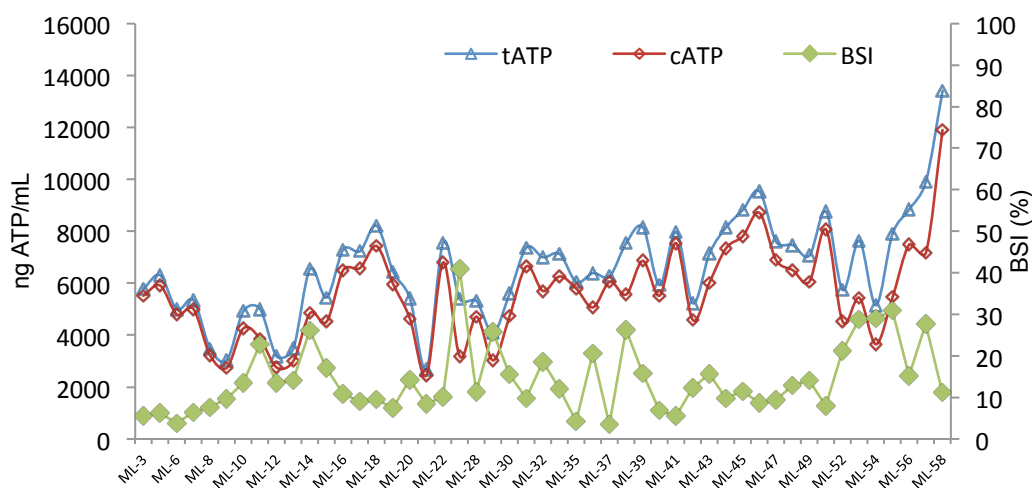


Figura 95. Evolución del ATP disuelto, ATP celular y del Índice de estrés del sistema (BSI).

A partir del ATPc puede calcularse el valor de la concentración de sólidos suspendidos activos del licor mezcla (SSVALM). A partir de este valor se ha calculado un nuevo valor de la CM, que se ha denominado  $CM_{ATP}$ . En la Tabla 43 se presenta el resumen de los datos calculados para ambas variables.

Tabla 43. Rango y valores promedio de la carga másica y los sólidos activos calculados en función del ATP

	CMATP Kg DBO5/ KgSSVALM	SSVALM mg/L	CM Kg DBO5/ KgSSVLM	SSVLM mg/L
Promedio	0,27	2807	0,14	5163
Máximo	0,64	5950	0,23	7569
Mínimo	0,06	1230	0,04	3619

CM, carga másica calculados en función de los sólidos suspendidos volátiles del licor mezcla, CMATP carga másica calculada a partir de los sólidos suspendidos volátiles activos del licor mezcla; SSVLM, Sólidos suspendidos volátiles del licor mezcla; SSVALM sólidos suspendidos volátiles activos del licor mezcla; BSI, índice de estrés del sistema

La Figura 96 muestra como los valores determinados para los SSVALM son menores que los SSVLM en todos los análisis realizados. Los valores de los SSVLM fueron, en promedio un 47% mayores que los SSVALM, alcanzando diferencias superiores al 70% (M12, M21 y M52). Las menores diferencias se observaron en M22, M39 y M58. En esta misma figura se ha representado el BSI, con el objetivo de valorar si estas diferencias se relacionaban con el estrés del sistema. El BSI más alto se obtuvo en la muestra 25, en este caso la diferencia entre los SSVLM y los SSVALM fue del 58%. Las muestras M12, M22 y M52, que presentaron las mayores diferencias entre estas dos variables, mostraron BSI moderados (14, 8 y 21%, respectivamente). Así mismo, las muestras que presentaron valores similares (M22, M39 y M58), mostraron también valores de BSI moderados, 10, 16 y 11%, respectivamente.

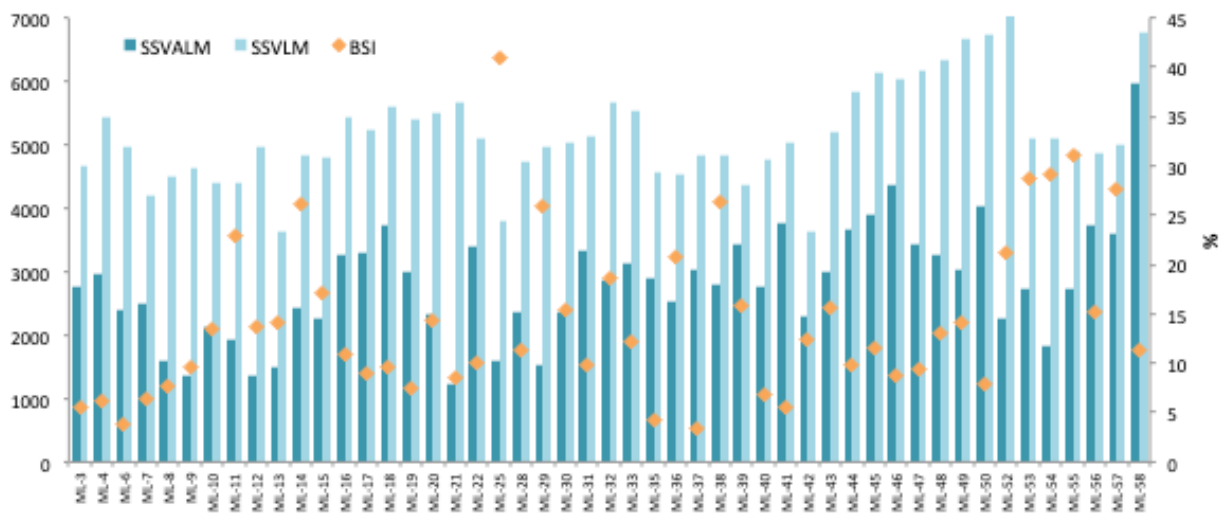


Figura 96. Valores de sólidos suspendidos volátiles del licor mezcla (SSVLM), los sólidos suspendidos volátiles activos del licor mezcla (SSVALM) y el índice de estrés del sistema (BSI).

La  $CM_{ATP}$  presentó valores superiores a la CM (Figura 97), puesto que la concentración de SSVALM fue menor que la concentración de SSVLM. La diferencia promedio entre estas dos variables coincidió con la de los SSVALM (46%) al igual que las muestras que presentaron valores de esta variable superiores de  $CM_{ATP}$  en torno al 70% (M12, M21 y M52). Así mismo, las muestras con CM y  $CM_{ATP}$  similares coincidieron con las que presentaron valores similares para los SSVLM y SSVALM (M22, M39 y M58).

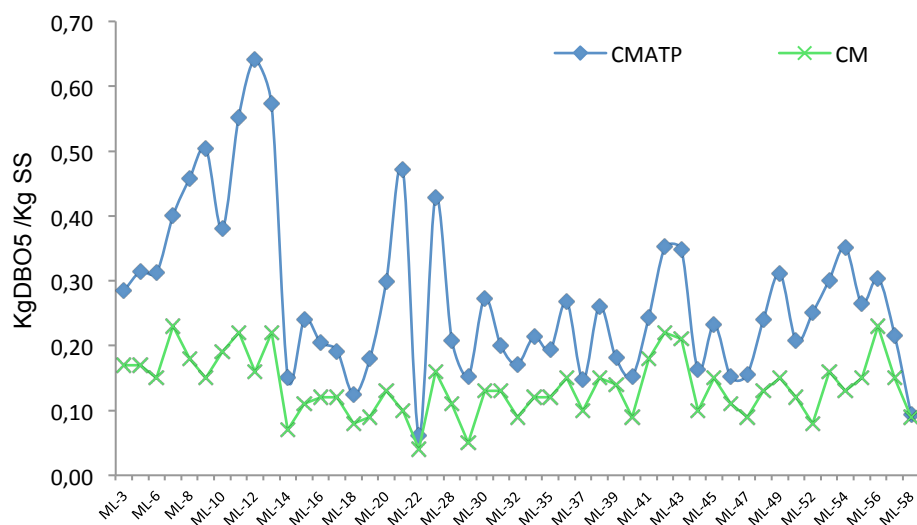


Figura 97. Valores de la carga másica calculados en función de los sólidos suspendidos volátiles del licor mezcla (CM) y la carga másica calculada a partir de los sólidos suspendidos volátiles activos del licor mezcla ( $CM_{ATP}$ ).

En la Figura 98 se representa la relación entre los SSVLM y los SSVALM. La correlación observada entre ambas variables ha sido significativa ( $R^2 = 0,27$ ,  $p = 0,01$ ).

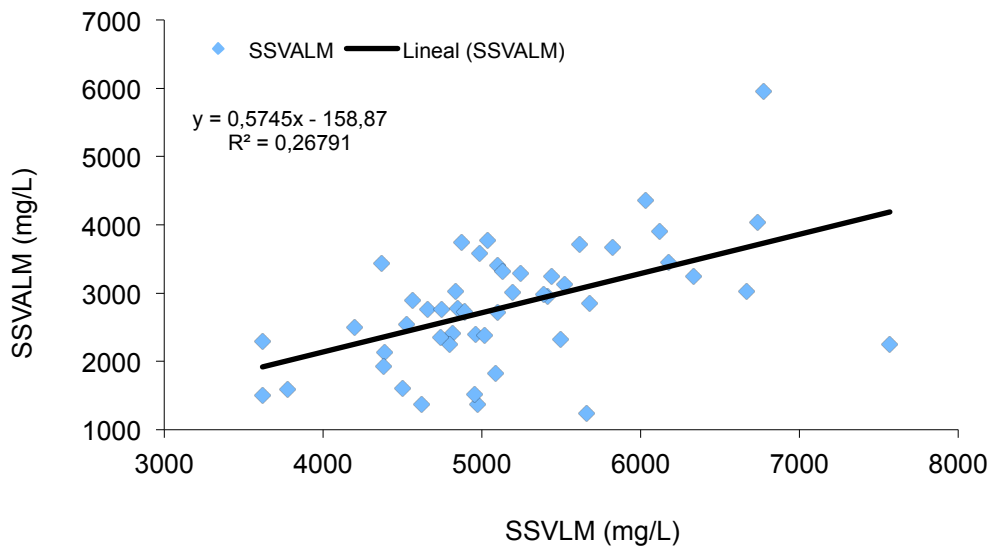


Figura 98. Correlación entre los sólidos suspendidos volátiles del licor mezcla (SSVLM) y los sólidos suspendidos volátiles activos del licor mezcla (SSVALM)

La Figura 99 muestra la relación entre la CM y la CMATP. Al igual que en el caso anterior La correlación observada entre ambas variables ha sido significativa ( $R^2 = 0,48$ ,  $p = 0,01$ ).

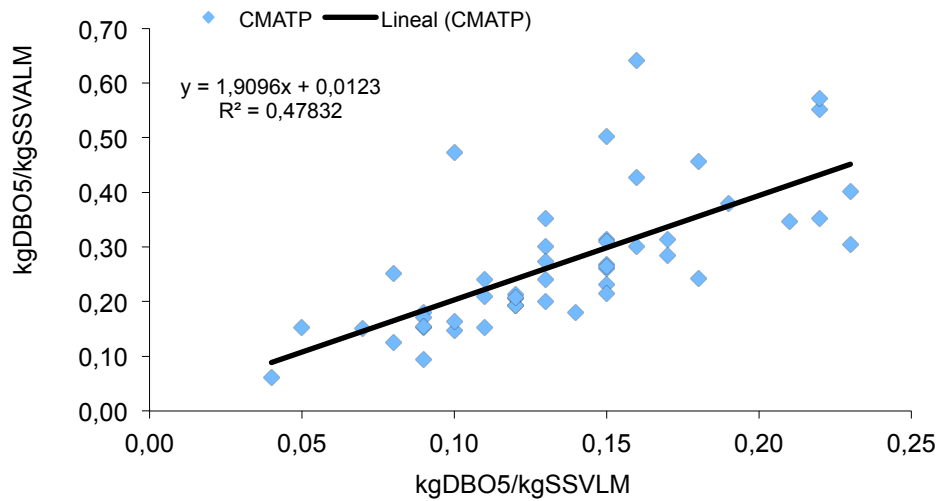


Figura 99. Correlación entre la carga másica calcula a partir de los sólidos suspendidos volátiles del licor mezcla (CM) y la carga másica calculada a partir de los sólidos suspendidos volátiles activos del licor mezcla (CMATP)

La respirometría es una herramienta que también aporta información sobre la biomasa activa en el sistema. En la Figura 100 se muestra la comparativa entre la medida de OURend y el cATP, ambas variables representan una medida directa de la biomasa activa en el sistema, aunque en el gráfico de la Figura 100 no se observa una relación aparente entre ambas.

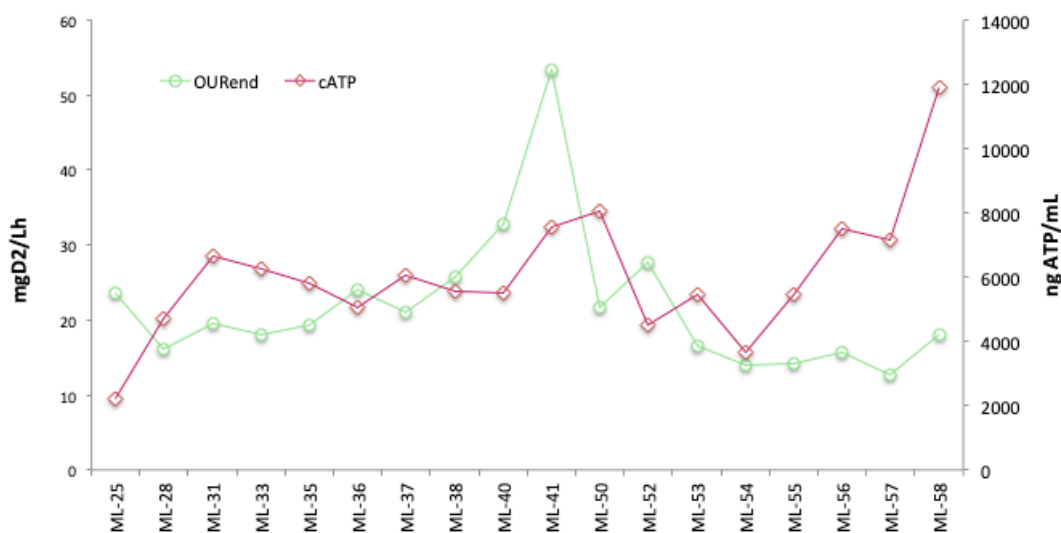


Figura 100. Comparativa de los valores determinados para el ATP celular (cATP) y la tasa de respiración endógena total (OURend)

Con el objetivo de valorar potenciales relaciones, que pueden surgir a partir de la introducción de la  $CM_{ATP}$  y los SSVAlM en la matriz de variables ambientales, se realizaron nuevamente todos los modelos lineales multivariantes.

El análisis de la nueva matriz de variables ambientales, no presentó cambios significativos en las relaciones determinadas previamente, respecto a la abundancias de las BN y los rendimientos del proceso de eliminación de amonio. Únicamente se observaron relaciones significativas en el modelo que explica la variabilidad observada en las variables respirométricas de la biomasa autótrofa.

En la Tabla 44 se observa que el BSI explicó un 49,3% de la variación de la tasa de respiración endógena de la biomasa autótrofa, la tasa máxima de respiración por nitrificación y sus respectivas tasas específicas.

Tabla 44. Resultados del test secuencial para el análisis DISTLM realizado entre la matriz ampliada de variables ambientales y las variables respirométricas de la biomasa autótrofa en la EDAR ML.

Test secuencial				
Variable	AICc	Pseudo-F	P	Prop
BSI	17	15,55	0,005	49,3
CM(DQOs)	15	3,90	0,035	10,5
T <sup>a</sup> r	15	2,89	0,081	6,9
CPTs	15	3,20	0,068	6,6
Variación total explicada				66,6

BSI, índice de estrés; CM(DQOs) carga másica en función de la DQOs; T<sup>a</sup>r, temperatura en el reactor; CPTs, concentración de fósforo total soluble.

En la Tabla 45 aparece el BSI relacionado positivamente con el eje 1 del dbRDA, así mismo todas las variables respirométricas se relacionaron negativamente con este eje. Esta relación indica que la actividad de la biomasa nitrificante se redujo cuando el BSI fue más elevado (Figura 101).

Tabla 45. Coeficientes de correlación múltiple parcial de la matriz ampliada de variables ambientales y correlaciones de las variables respirométricas de la biomasa autótrofa con los ejes del dbRDA en la EDAR ML

	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3	dbRDA4
% variación explicada	59,71	12,51	0,98	0,02
Variable	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3	dbRDA4
BSI	0,875	0,026	-0,482	-0,019
CM(DQOs)	-0,267	0,022	-0,516	0,814
T <sup>a</sup> r	-0,227	0,849	-0,352	-0,321
CPTs	-0,333	-0,527	-0,614	-0,484
OURend.A	-0,708	0,364	0,108	-0,014
SOURA	-0,622	0,428	-0,112	0,011
Rsp	-0,875	-0,271	0,081	0,017
Rs	-0,857	-0,334	-0,091	-0,015

OURendA, tasa de respiración endógena de la biomasa autótrofa; SOURendA, tasa de respiración endógena específica de la biomasa autótrofa; Rs tasa máxima de respiración por nitrificación; Rsp, tasa máxima específica de respiración por nitrificación.

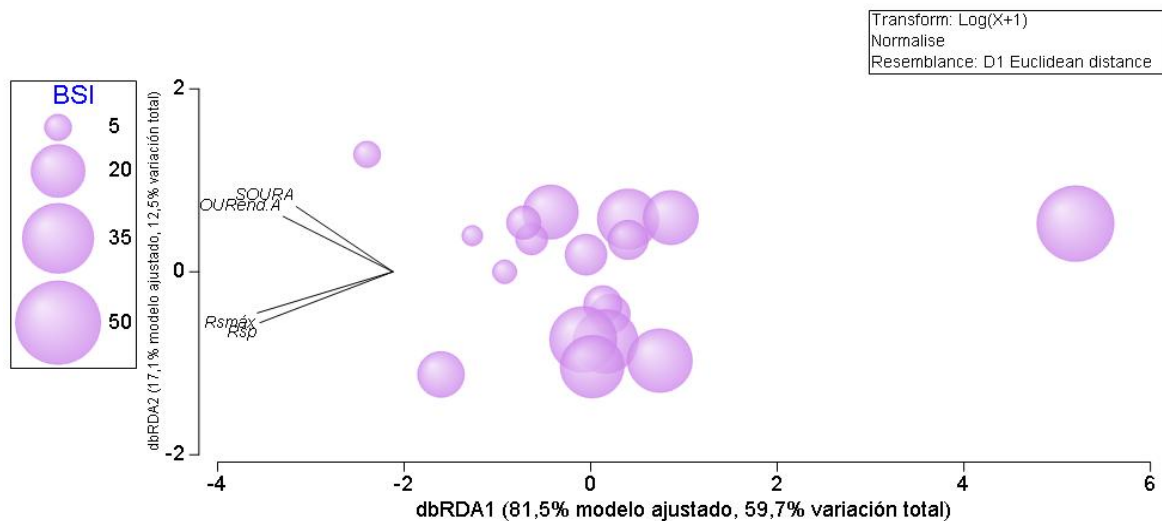


Figura 101. Gráfico de burbujas del rendimiento de eliminación del nitrógeno total soluble (rNTs) en el dbRDA ilustrando el DISTLM basado en la relación entre las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus rendimientos de eliminación y la abundancia relativa de bacterias nitrificantes en la determinada por FISH y Illumina en la EDAR ML.

Los vectores superpuestos corresponden a coeficientes de correlación de Pearson mayores de 0,40 y -0,40. OUR<sub>endA</sub>, tasa de respiración endógena de la biomasa autótrofa; SOURA, tasa de respiración endógena específica de la biomasa autótrofa; R<sub>s</sub> tasa máxima de respiración por nitrificación; R<sub>sp</sub>, tasa máxima específica de respiración por nitrificación.





## 5. Discusión

---



## 5.1 ANÁLISIS DE LA DINÁMICA POBLACIONAL DE LAS BACTERIAS NITRIFICANTES

En el siguiente apartado se analizan y discuten los resultados obtenidos tras la aplicación de la técnica molecular FISH, combinada con microscopía de epifluorescencia, en 188 muestras de fango activo. El objetivo de estos análisis fue determinar la composición y las variaciones de la comunidad de BN en los reactores analizados (CT1, CT2, CX, DN, QB y ML) durante el periodo de estudio específico de cada uno de ellos.

Los análisis FISH mostraron que la fracción de biomasa nitrificante varió significativamente de unas EDAR a otras. La fracción más elevada se observó en la EDAR QB, donde las BN representaron entre el 1 y 10% de la biomasa total del sistema. A pesar de que esta EDAR presentó las mayores abundancias relativas, no obtuvo los rendimientos de eliminación de amonio más elevados ( $78,9 \pm 18,6\%$ ). La abundancia más baja se observó en la EDAR ML, donde la fracción nitrificante estuvo comprendida entre el 1 y 4%. Esta EDAR, en cambio, presentó rendimientos de eliminación de amonio más estables y elevados ( $91,0 \pm 14,0\%$ ) que la EDAR QB. En el resto de reactores se observaron abundancias entre el 1 y 8%. De estas observaciones se deduce que una mayor abundancia relativa de población de nitrificante, determinada según FISH, no asegura mayores rendimientos de eliminación de amonio.

Tradicionalmente se ha considerado que, para una nitrificación adecuada en las instalaciones convencionales de eliminación de nutrientes, la biomasa nitrificante debe estar comprendida entre el 4 y 6% (Nielsen *et al.*, 2004). A pesar de ello, en estudios posteriores se recoge una amplia variación de fracciones de la población nitrificante en los sistemas de depuración. Esta fracción oscila desde el 0,39% detectado en un sistema de fangos activos (Dionisi *et al.*, 2002) hasta más del 18% en un sistema de fangos activos combinado y un contactor biológico rotatorio (You *et al.*, 2003).

La fracción de BOA fue mayor que la fracción de BON en la mayoría de las muestras. Únicamente 9 de las 188 muestras presentaron mayores porcentajes de BON que de BOA. Las relaciones entre ambos grupos variaron dependiendo de la EDAR analizada. Mientras que en las EDAR DN y ML las relaciones más frecuentes fueron 1:1 y 2:1, en la

EDAR CX la relación más frecuente fue 1:1 y en las EDAR CT y QB, habitualmente la relación fue mayor de 2. De acuerdo con la termodinámica y la transferencia de electrones, en un sistema de nitrificación equilibrado la relación numérica de BOA a BON debe ser 2:1 (Arciero *et al.*, 1991; Hooper *et al.*, 1997; Mari *et al.*, 2012). Según esto las BOA deberían ser las bacterias dominantes en una comunidad nitrificante, lo cual es coherente con los resultados obtenidos en este estudio, aunque no siempre se mantuvo la proporción 2:1. La bibliografía existente recoge tanto relaciones mayores (Li *et al.*, 2007), como menores (Ramdhani *et al.*, 2013) en sistemas de fangos activos con una eliminación de amonio eficiente. Así mismo, se han observado sistemas con abundancias de BON incluso 3 veces superiores a las de BOA para el género *Nitrospira* (Harms *et al.*, 2003). A día de hoy, en base a los recientes avances en el conocimiento sobre la versatilidad metabólica de estas poblaciones, como el descubrimiento de las bacterias commamox, estas relaciones deben ser reevaluadas, ya que, tal y como muestran estos estudios, las relaciones son muy variables a pesar de haber sido detectados sistemas con eliminaciones de nitrógeno satisfactorias.

Tal y como se ha comentado anteriormente, en los reactores de las EDAR CT y QB se observaron las relaciones BOA:BON más elevadas. En la EDAR QB estos valores fueron originados por la elevada concentración de BOA, sin embargo en la EDAR CT fueron debidos a la baja concentración de BON detectada. El reactor CT1, donde la fracción de NOB fue menor, presentó los mayores porcentajes y concentraciones de nitrito en el efluente ( $52,0 \pm 23,8\%$  y  $2,0 \pm 1,7$  mg N-NO<sub>2</sub>/L, respectivamente). El análisis DISTLM realizado para valorar la contribución de las BN a la eliminación del amonio, determinó que el %NO<sub>2</sub> en el efluente, fue una variable relacionada con la dinámica poblacional de las BN en la EDAR CT. Aunque esta variable estuvo más relacionada con el eje 2 del dbrDA, en el eje 1 se relacionó negativamente con la abundancia relativa del *Nitrotoga sp.* lo cual es coherente con estas observaciones, ya que este fue el género dominante en la oxidación del nitrito en esta EDAR. Este resultado indica que relaciones BOA:BON superiores a 2:1 pueden ser indicativas de una nitrificación incompleta en el reactor CT1.

El análisis nMDS realizado para las EDAR CT, DN, QB y CX en función del factor reactor mostró que existen diferencias significativas en la dinámica poblacional de estos reactores. Los reactores estudiados en esta tesis presentan sistemas de tratamiento

diferentes y diferentes parámetros de operación, que originan respuestas diferentes en los procesos de nitrificación. Es por ello que en cada una de las EDAR la dinámica poblacional de las bacterias nitrificantes parece responder a factores diferentes.

Existen estudios que han observado que el tipo de sistema de tratamiento puede influir en la abundancia de las diferentes especies nitrificantes. En el estudio de Dytczak *et al.* (2008) se operaron dos reactores con diferentes configuraciones y las mismas condiciones de operación: uno de los reactores trabajó en ciclos (óxico/anóxico) y el otro operó únicamente de manera aerobia. Las condiciones de operación en ciclos fueron favorables para el proceso de nitrificación, y favorecieron el crecimiento de los microorganismos nitrificantes más rápidos (*Nitrosomonas* y *Nitrobacter*). El reactor aerobio y estático favoreció el crecimiento de las nitrificantes más lentas (*Nitrosospira* y *Nitrospira*). En el presente estudio el reactor QB operó en condiciones de alternancia óxicas y anóxicas, sin embargo la población de este reactor estuvo compuesta principalmente por los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrospira*. Este reactor se diferenció del resto de reactores del estudio en que no se detectaron poblaciones de *Nitrosomonas* halotolerantes, las cuales suelen mostrar menores tasas de crecimiento que las poblaciones de *N. oligotropha*. Las diferencias encontradas respecto al estudio de Dytczak pueden ser debidas a las características del afluente o a las diferencias en la operación de los ciclos.

Según el análisis ANOSIM las diferencias más significativas entre reactores respecto a la dinámica poblacional de las BN, se observaron entre los reactores CT2-DN y QB-CT2. Los reactores CT1 y CT2 presentaron abundancias de BOA entorno a la media y abundancias de NOB inferiores a la media. Ambos reactores estuvieron marcados por la presencia de *Nitrotoga*, mientras que en DN y QB estos géneros no tuvieron representación. Ambos factores, fueron probablemente los que marcaron las diferencias observadas en este análisis.

Los análisis estadísticos no mostraron patrones estacionales en ninguna de las EDAR analizadas. Estas observaciones son consistentes con el estudio de Ju y Zhang (2015) en el que no se observaron patrones estacionales en las poblaciones nitrificantes tras la monitorización de la comunidad microbiana en una EDAR urbana durante 5 años.

### 5.1.1 Dinámica poblacional de las bacterias oxidantes del amonio

Los análisis realizados con FISH mostraron que todas las BOA detectadas estuvieron relacionadas con el género *Nitrosomonas*. Este género se encuentra comúnmente gobernando los sistemas de eliminación biológica de nutrientes, tanto en fangos activos, como en fangos granulares y biopelículas (Tsuneda *et al.*, 2003; Chen y Wong, 2004; Mota *et al.*, 2005; Wells *et al.*, 2009).

El género *Nitrosomonas* estuvo representado principalmente por miembros del linaje de *N. oligotropha*. El linaje *Nitrosomonas euroapea-eutropha* (sonda Nse1472) no presentó señales de hibridación positivas en ninguno de los reactores estudiados. Así mismo tampoco se observó la presencia de *Nitrosococcus mobilis* (sonda NmV). Estos resultados, junto con los de la sonda NEU, indican que las especies hibridadas con esta última sonda no se corresponden con las especies *Nc. mobilis*, *N. halophila*, *N. europaea* y *N. eutropha*, o bien que estas especies no se detectaron debido a su baja abundancia o baja intensidad de la señal de hibridación, por lo que no se consideraron especies funcionalmente importantes. Estas situaciones pueden ocurrir cuando el contenido de ribosomas celulares está debajo del límite de detección del protocolo estándar de FISH (1400 ribosomas/célula) (Hoshino *et al.*, 2008). Las señales de hibridación observadas con la sonda NEU también pueden ser debidas a la presencia de las especies *Nitrosomonas aestuarii*, *N. crytolerance* o *N. marina* (Jurerschko *et al.*, 1998).

Si realizamos la suma de los porcentajes de hibridación de las sondas Nmo218 y NEU y los comparamos con el porcentaje obtenido con la sonda Nso1225<sub>LNA</sub> podemos observar que las cantidades son aproximadas en la mayoría de los casos. Las discrepancias observadas pueden ser debidas a la incertidumbre de la propia técnica y a una posible pérdida de información durante la cuantificación y el tratamiento de imagen. Las BOA y las BON en los sistemas de fangos activos, suelen formar densos agregados celulares, que en ocasiones dan como resultado una distribución no uniforme, típica de estas poblaciones (Daims *et al.*, 2001a). Es por ello que para la correcta cuantificación de las poblaciones nitrificantes, en muestras hibridadas procedentes de sistemas de fangos activos, sea importante asegurar la homogeneidad de la muestra. La medida de las áreas de una muestra no homogénea produce una mayor dispersión, que puede dar lugar a resultados erróneos, si no se aumenta el número de imágenes analizadas (Borras, 2008). Para disminuir la

dispersión es recomendable utilizar los menores aumentos posibles, asegurando que el campo de visualización cubra suficiente biomasa flocular. Esta condición en ocasiones no es posible, sobre todo cuando se trata de la cuantificación de BN de menor tamaño, como *Nitrospira*, poblaciones menos abundantes o señales de hibridación menos intensas. En estos casos, la correcta identificación requiere distinguir claramente la morfología celular y la señal de hibridación respecto a la fluorescencia de fondo, para evitar que falsas señales de hibridación pasen desapercibidas, que implica la utilización de 600 o 1000 aumentos.

El linaje *N. oligotropha* coexistió en la mayoría de las EDAR con el grupo de *Nitrosomonas* halotolerantes (sonda NEU) (CT, CX, DN y ML), que no pertenecen al linaje de *N. europaea-eutropha*. Este linaje se ha identificado como dominante en sistemas con elevadas concentraciones de amonio afluyente, como reactores de nitrificación parcial (Limpiyakorn *et al.*, 2007; González-Martínez *et al.*, 2014). Las especies del linaje de *N. oligotropha* aparecen en sistemas donde las concentraciones de amonio son menores (Dionisi *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2008). *N. oligotropha* fue la BOA dominante en sistemas con concentraciones de amonio menores de 0,5 hasta 13 mgN-NH<sub>4</sub>/L (Lydmark *et al.*, 2007). Las abundancias más elevadas del género *Nitrosomonas* y el linaje *N. oligotropha* se observaron en la EDAR QB, seguida por la EDAR CT, cuyas concentraciones de amonio afluyente fueron las más elevadas del rango de las EDAR analizadas. Las especies de *Nitrosomonas* halotolerantes identificadas con la sonda NEU presentaron mayor abundancia en la EDAR CX.

La concentración de amonio es uno de los factores más relacionados con la distribución de los diferentes géneros de BOA en EDAR (Limpiyakorn *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2008). En esta tesis se ha utilizado el valor de la carga de amonio, en lugar de la concentración, con el objetivo de estandarizar su valor respecto a la cantidad de sólidos del sistema. Si atendemos a la variabilidad observada en la concentración de amonio afluyente observamos que las EDAR CX y QB presentaron cargas de amonio similares (aproximadamente  $61 \pm 24$  mgN/gSSVLM d), sin embargo sus poblaciones nitrificantes presentaron claras diferencias. Mientras que en la EDAR CX se registraron las abundancias más elevadas del grupo de *Nitrosomonas* halotolerantes, en la EDAR QB no se observaron señales positivas de hibridación para este grupo. Del mismo modo, en los reactores de la EDAR CT, donde las cargas de amonio fueron ligeramente superiores (aproximadamente

70±20 mgN/gSSVLM·d) las abundancias de estas especies fueron menores del 1%. En contraste, en la EDAR DN, donde se observaron bajas cargas de amonio (20±8 mgN/gSSVLM·d), los diferentes linajes de BOA coexistieron en abundancias relativas promedio del 1%. De estos resultados se deduce que probablemente existan otros factores que, junto con la concentración de amonio, influyan en la distribución de los diferentes linajes de *Nitrosomonas*. Los efectos de la carga de amonio se discuten con mayor detalle en el apartado 5.3.1 “Carga de amonio y fósforo”.

No se obtuvieron señales positivas para ninguna de las sondas de AOA utilizadas. Resultados similares han sido obtenidos en estudios anteriores (Geets *et al.* 2007; Zhang *et al.*, 2011). Desde su descubrimiento, las AOA han sido detectadas en diferentes sistemas biológicos de depuración (Mußmann *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2018), donde su abundancia aparece asociada principalmente a bajas concentraciones de amonio. En el estudio realizado por Limpitayakorn *et al.* (2011) se utilizó la técnica de qPCR para comparar la abundancia de los genes *amoA* de las BOA y las AOA en 7 EDAR. Los resultados de este estudio mostraron que las EDAR con mayores concentraciones de amonio afluente y efluente (36,1-422,3 mgN/L y 5,3-29,2 mgN/L respectivamente), presentaron concentraciones de *amoA* BOA cuatro órdenes de magnitud mayores, que de *amoA* AOA, que se mantuvo en ocasiones por debajo del límite de detección. En este estudio los genes *amoA* AOA presentaron mayores abundancias en las EDAR con concentraciones de amonio menores en el afluente y en el efluente (5,6-11,0 mgN/L y 0,2-3 mgN/L, respectivamente). En el presente estudio las concentraciones de amonio afluente se situaron fuera de los rangos habituales reportados para las AOA en el estudio de Limpitayakorn *et al.* (2011), ya que todas las concentraciones de amonio se situaron en promedios mayores de 25 mgN/L. Algunos estudios apuntan que, las principales variables que determinan el nicho ecológico de las AOA son: baja concentración de amoníaco, bajo pH y a presencia de antibióticos o ciertos compuesto industriales como el petróleo, condiciones que no suelen ser habituales en los sistemas convencionales de tratamiento de ARU (Mußmann *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2015).



### 5.1.2 Dinámica poblacional de las bacterias oxidantes del nitrito

Los géneros responsables de la oxidación del nitrito en las EDAR estudiadas fueron *Nitrospira* (sonda Ntspa662) en las EDAR CX, DN y QB, y *Nitrotoga* (sonda Ntoga122) en los dos reactores de la EDAR CT. En la EDAR ML ambas poblaciones mostraron abundancias relativas y frecuencias de aparición similares. El género *Nitrobacter* únicamente fue detectado en las EDAR DN y ML. *Nitrospira* y *Nitrobacter* presentan afinidades diferentes por el nitrito y por el oxígeno con valores de  $K_{OD}=0,13-1,47$  mgO<sub>2</sub>/L,  $K_{NO_2}=0,14-0,50$  mgN-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L y  $K_{OD}=0,17-4,42$  mgO<sub>2</sub>/L,  $K_{NO_2}=1,49-7,00$  mgN-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L, respectivamente (Laanbroek *et al.*, 1994; Schramm *et al.*, 1999; Manser *et al.*, 2005; Vadivelu *et al.*, 2006c), es por ello que están adaptadas a entornos diferentes. A pesar de ello su coexistencia ha sido previamente descrita (Siripong y Rittman 2007).

El género *Nitrospira* coexistió con el género *Nitrotoga* en las EDAR CT, CX y ML. *Nitrotoga* es uno de los géneros descubiertos más recientemente y ha sido identificado como BON dominante en sistemas de fangos activos (Lücker *et al.*, 2014; Saunders *et al.*, 2016). En el estudio de Lücker *et al.* (2014) *Nitrotoga* fue detectada en muestras de fangos activos de 20 EDAR. En estas EDAR *Nitrotoga* coexistió con el género *Nitrospira* en abundancias comparables, o fue la única BON detectada. En el estudio de Lücker *et al.* (2014) *Nitrotoga* se mantuvo activa para diferentes concentraciones de amonio afluente (21,25 a 60 mgN/L) y su presencia se vio favorecida por las bajas temperaturas.

*Nitrospira* ha sido identificado como el género predominante en los sistemas de tratamiento de ARU en numerosos estudios (Dionisi *et al.* 2002; Freitag *et al.* 2005). La selección de *Nitrospira* como especie dominante suele atribuirse a su estrategia de supervivencia (K-estrategia), gracias a la que se ve favorecida en entornos con bajas concentraciones de nitrito (Chiellini *et al.*, 2013). Aunque en este estudio las transformaciones de las diferentes fracciones del nitrógeno en los reactores no ha sido monitorizadas, podemos suponer que la concentración de nitrito depende del amonio oxidado en la primera fase de la nitrificación. Es por ello que, en las EDAR donde el afluente presentó menores concentraciones de amonio (DN y ML), probablemente la concentración de nitrito alcanzada tras la oxidación del amonio fue menor; mientras que en el supuesto contrario, serían resultantes mayores concentraciones de nitrito. En este caso, habría que excluir los reactores de la EDAR CT, donde no se puede asegurar esta

conversión debido a los bajos rendimientos de eliminación de amonio observados (41% y 44% para CT1 y CT2, respectivamente).

Las mayores abundancias del género *Nitrospira* fueron detectadas en la EDAR DN. Esta EDAR se caracterizó por sus elevados TRC ( $25,9 \pm 22,9$  días). Los elevados TRC provocan la aparición de bajas cargas de amonio (y por extensión de nitrito), condiciones que favorecen el crecimiento de los K-estrategas, como *Nitrospira* (Chiellini *et al.*, 2013). La EDAR QB también presentó elevadas abundancias de *Nitrospira*, sin embargo, sus TRC fueron inferiores a los de DN ( $10,6 \pm 5,7$  días). La EDAR ML, que operó con TRC de  $12,9 \pm 4,8$  días mostró las menores concentraciones de BOD, tanto para *Nitrospira* como para *Nitrotoga*. En los reactores CT1 y CT2, donde se registraron los menores TRC ( $5,7 \pm 1,6$  y  $8,0 \pm 7,3$  días respectivamente) se observaron bajas abundancias relativas de *Nitrospira* en favor de mayores abundancias de *Nitrotoga*. La coexistencia de estas especies probablemente se debe a que presentan nichos ecológicos interrelacionados pero distintos, pudiendo ser el TRC uno de los factores que influyen en esta separación. La reducción de la abundancia del género *Nitrospira* con la reducción del TRC ha sido descrita con anterioridad (Phan *et al.*, 2016). En el estudio de Phan *et al.* (2016) se evaluó la respuesta de las diferentes poblaciones nitrificantes a las variaciones del TRC, en un reactor a escala piloto. En este estudio se observó que la disminución del TRC contribuyó a la disminución de la abundancia relativa del género *Nitrospira* (determinada mediante pirosecuenciación 454). Sin embargo, en el presente estudio el TRC, a priori, no consiguió explicar las diferencias observadas en las abundancias relativas del género *Nitrospira* en los reactores analizados.

Únicamente el modelo lineal multivariante obtenido para valorar las relaciones existentes entre la abundancia de bacterias nitrificantes determinada mediante FISH y Illumina respecto a las variables ambientales y operacionales en la EDAR ML, seleccionó el TRC como variable explicativa de su estructura poblacional. A pesar de ello, esta variable no se relacionó significativamente con ninguna de las especies nitrificantes, por lo que no es posible valorar su contribución a la variación observada.

### 5.1.3 Variables ambientales y operacionales relacionadas con la dinámica poblacional de las bacterias nitrificantes

En este apartado se pretende valorar qué factores ambientales o combinación de ellos fueron selectivos y capaces de generar nichos ecológicos concretos que regulen la abundancia de las poblaciones nitrificantes. Estos factores pueden ser los responsables de las diferentes respuestas observadas en los microorganismos con las mismas funciones.

#### *Oxígeno disuelto*

Los valores de oxígeno aportados por las EDAR CT, CX, DN y QB se dividieron en tres rangos:  $O_2 < 0,8$  mg/L (OD bajo),  $0,8 < O_2 < 2$  mg/L (OD medio) y  $O_2 > 2$  mg/L (OD alto). Cada uno de ellos indican el porcentaje de tiempo en el que la concentración de oxígeno se mantuvo en cada rango de valores. A pesar de que esta es una categorización precisa de la situación de la concentración de OD en el reactor, no permite aportar datos sobre cuál fue el valor promedio de la concentración de oxígeno, ni cuáles fueron los máximos o mínimos alcanzados por esta variable en el periodo de estudio.

Las concentraciones de oxígeno fueron un factor diferenciador de las EDAR analizadas. El reactor CX mantuvo concentraciones de OD superiores a 2 mg/L el 97% del tiempo. La EDAR DN, sin embargo, operó con concentraciones de OD inferiores a 0,8 mg/L el 65% del tiempo. En los reactores CT las concentraciones de oxígeno se mantuvieron por encima de 0,8 mg/L la mayor parte del tiempo (98% y 93% para CT1 y CT2 respectivamente), siendo el 52 y 48% del tiempo superiores a 2 mg/L, en cada uno de ellos respectivamente. El reactor QB mantuvo el 61% del tiempo su concentración de OD entre 0,8 y 2 mg /L.

El OD fue seleccionada como variable explicativa en todos los modelos que relacionaron la dinámica poblacional de las bacterias nitrificantes con la matriz de variables ambientales (exceptuando la EDAR ML), aunque únicamente fue significativa en los modelos de la EDAR DN.

En la EDAR DN el OD fue la variable que explicó mayor porcentaje de variabilidad en la dinámica poblacional de las bacterias nitrificantes. Esta EDAR se caracterizó por mantener concentraciones de OD inferiores a 0,8 mg/L la mayor parte del

tiempo, manteniendo una población nitrificante abundante y una eliminación de amonio satisfactoria. Las condiciones que permiten a esta EDAR mantener bajos porcentajes de oxígeno son el control del sistema de aireación mediante lógica difusa, las bajas CM (0,14) y las bajas concentraciones de amonio de entrada ( $27 \pm 13$  mg/L). El porcentaje de tiempo que el oxígeno disuelto se mantuvo entre 0,8 y 2 mg/L el reactor presentó una correlación positiva elevada con la abundancia del género *Nitrospira*. Según el análisis DISTLM concentraciones superiores a 0,8 mgO<sub>2</sub>/L favorecieron la abundancia del género *Nitrospira*. Otros estudios han observado que *Nitrospira* spp. fue competitiva en EDAR para concentraciones de OD bajas en combinación de TRC cortos (Huang *et al.*, 2010). Esto es debido a su mayor afinidad por el OD, que utiliza como estrategia para sobrevivir en entornos pobres en oxígeno. La sensibilidad de las BON y las BOA a valores bajos de oxígeno fue estudiada en el estudio de Liu *et al.* (2016), en este estudio se demostró que las BON tuvieron una tasa de recuperación menor que las BOA cuando se sometieron a periodos limitados de oxígeno, que explicaría la dinámica observada para *Nitrospira* en el presente estudio.

Las concentraciones de oxígeno en el reactor superiores a 2 mg/L se relacionaron negativamente con la abundancia de *N. oligotropha*, *Nitrobacter* y el grupo de *Nitrosomonas* halotolerantes en niveles de correlación diferentes. Para la interpretación de este resultado hay que tener en cuenta que la concentración de oxígeno en el reactor únicamente se mantuvo por encima de 2 mg/L el 1% del tiempo, que supone un periodo de tiempo demasiado pequeño para ejercer una presión selectiva.

En el resto de EDAR, aunque no de manera significativa, se observa una tendencia de los diferentes géneros de bacterias nitrificantes a disminuir conjuntamente con las variables ODm y ODa. El oxígeno es un parámetro clave para el funcionamiento del proceso de nitrificación debido a que determina la actividad de las bacterias nitrificantes en entornos competitivos como son las EDAR. Los estudios de Limpiyakorn *et al.* (2005) y Park *et al.* (2008), observaron que las variaciones que la concentración de oxígeno no influyeron en la composición de la comunidad BOA, aunque sí en su actividad. Posteriormente Wells *et al.* (2009) y Wang *et al.* (2012) observaron que esta variable además influye en la composición de la comunidad nitrificante en sistemas a escala real. En el estudio de Wang *et al.* (2012) se evaluó la correlación entre 10 variables operacionales y

ambientales mediante análisis de correspondencias canónico, determinando que el OD fue una variable explicativa importante que afecta a la dinámica de la comunidad BOA.

Las bacterias nitrificantes tienen diferentes constantes de saturación de oxígeno, incluso dentro del mismo género. Los resultados obtenidos en esta tesis indican que la concentración de OD es una de las variables más relacionadas con la abundancia de las poblaciones nitrificantes. El análisis estadístico de los datos sugiere que el OD ejerció una presión significativa mayor sobre las BON que sobre las BOA. A pesar de ello, no se ha podido determinar si ejerce una presión significativa en función de los diferentes géneros y linajes estudiados. La mayor influencia observada en la EDAR DN pudo ser debida a que esta EDAR operó en un rango de valores más bajos de oxígeno que el resto de EDAR, que pudieron llegar a ser un factor limitante del crecimiento de las poblaciones del género *Nitrospira*.

### Temperatura

El rango de temperaturas varió entre las EDAR analizadas en este estudio. Las menores temperaturas se registraron en la EDAR DN, con mínimos de 11 °C, mientras que las máximas temperaturas se registraron en la EDAR ML donde se llegaron a alcanzar hasta 32 °C. Las medias anuales se situaron entre los 19±4 °C y los 24±5 °C, respectivamente en las EDAR DN y ML.

La temperatura fue seleccionada en tres modelos como variable explicativa. En las EDAR QB y CX la temperatura fue una variable poco significativa, sin embargo en la EDAR ML esta variable mostró correlaciones elevadas con el género *Nitrotoga*. En el modelo seleccionado para las 76 muestras analizadas por FISH y en el modelo donde se analizaron conjuntamente los resultados de las 24 muestras analizadas con Illumina y sus análogas analizadas por FISH, la abundancia de este género se correlacionó con bajas temperaturas. Este último modelo, además, correlacionó abundancias mayores del género *Nitrosomonas* con temperaturas más elevadas. Esto pone de manifiesto que el género *Nitrotoga*, perteneciente a las BON resultó competitivo a temperaturas más bajas. Concretamente su abundancia se relacionó con temperaturas inferiores a 23°C.

Una de las principales diferencias del género *Nitrotoga* respecto al resto de bacterias nitrificantes es su capacidad de crecimiento a bajas temperaturas. Su temperatura de incubación óptima ha sido considerada en torno a los 17 °C (Nowka *et al.*, 2015), aunque los primeros cultivos puros de este género sugieren que estas temperaturas pueden ser superiores. El reciente aislamiento de *Candidatus Nitrotoga fabula* procedente de un sistema de fangos activos (Kitzinger *et al.*, 2018), sitúa las temperaturas de crecimiento óptimas para esta especie en torno a los 24 °C, frente a enriquecimientos previos de *Nitrotoga* que determinaron temperaturas menores (Alawi *et al.*, 2007; White *et al.*, 2012; Ishii *et al.*, 2017). A pesar de ello, estas temperaturas siguen siendo menores que las del resto de bacterias nitrificantes, las cuales son mesófilas y presentan unas tasas óptimas de crecimiento en torno a los 28 °C. Es por ello que este género puede competir ventajosamente con otros BON, especialmente en hábitats fríos (Nowka *et al.*, 2015), tal y como se ha observado en los resultados del análisis multivariante.

Curiosamente *Nitrotoga* spp. no fue detectada en las EDAR que presentaron menores temperaturas, como DN. Lo cual indica que debe haber otros factores selectivos, además de la temperatura, que potencien el crecimiento de estas comunidades.

Uno de los datos que puede explicar porqué la temperatura fue seleccionada como variable explicativa en la EDAR ML y no en las EDAR CT y CX, es que las EDAR CT y CX presentaron temperaturas máximas en torno a los 26 y 29 °C, respectivamente, mientras que en la EDAR ML se alcanzaron temperaturas en torno a los 32 °C. Este aumento de 3°C y 6°C respectivamente, podría ser la causa por la que la temperatura sea una variable significativa para las BN en la EDAR ML.

### *Carga orgánica*

La carga másica fue una de las variables de proceso que varió de unas EDAR a otras. Las menores cargas másicas se observaron en la EDAR ML ( $0,10 \pm 0,01$  KgDBO<sub>5</sub>/KgSSVLM), seguida de la EDAR DN ( $0,14 \pm 0,04$  KgDBO<sub>5</sub>/KgSSVLM). Los valores más elevados fueron los de la EDAR CX ( $0,31 \pm 0,11$  KgDBO<sub>5</sub>/KgSSVLM). Este parámetro resultó significativo en el DISTLM obtenido para la EDAR DN. CM mayores de 0,15 se relacionaron con abundancias mayores del linaje *N. oligotropha*, del grupo de *Nitrosomonas* halotolerantes y del género de BON *Nitrobacter*.

Habitualmente en los estudios realizados por otros autores se han encontrado correlaciones negativas entre esta variable y la población de bacterias nitrificantes (Xia *et al.*, 2008). Los resultados positivos observados en la EDAR DN, a diferencia de los observados en otros estudios, son debidos al rango de valores que la CM toma en este sistema ( $0,15 \pm 0,01$  KgDBO<sub>5</sub>/KgSSVLM). Por tanto, cargas másicas elevadas de este sistema se corresponde con cargas medias-bajas en sistemas convencionales. Valores más bajos de esta variable podrían convertirse en factores limitantes del crecimiento.

El porcentaje de DQOs y la relación DQO/DBO<sub>5</sub> fueron seleccionadas, por los análisis multivariantes, como variables explicativas de la dinámica poblacional de las BN en las EDAR CT, DN y QB. Los porcentajes de DQOs más elevados se observaron en las EDAR ML ( $69 \pm 12\%$ ) y QB ( $52 \pm 8\%$ ). El modelo construido en la EDAR QB indica que porcentajes de DQOs inferiores al 50% se correlacionaron con el aumento de la abundancia relativa de los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrotoga* y los miembros del linaje de *N. oligotropha*. La EDAR CT presentó porcentajes de DQOs inferiores a QB ( $45 \pm 10\%$  y  $38 \pm 13\%$ , para CT1 y 2, respectivamente) aunque también presentó la misma tendencia. En esta EDAR el porcentaje de DQOs se relacionó negativamente con el género *Nitrotoga*, aunque el DISTLM determinó que no resultó una variable significativa. En la EDAR DN la relación DQO/DBO<sub>5</sub> a pesar de ser una variable significativa, no se correlacionó significativamente con ninguna de las BN monitorizadas.

Los cambios en la composición del sustrato pueden afectar a la actividad fisiológica celular y con ello producir cambios en la composición de la comunidad microbiana. El %DQOs es un valor aproximado de la concentración de materia orgánica fácilmente biodegradable en el medio. La monitorización de esta variable proporciona información acerca de los requerimientos de oxígeno del sistema, y puede alertar de posibles cambios en los rendimientos del proceso, derivados de la respuesta metabólica del sistema a las variaciones de este parámetro. La modificación de la composición bacteriana debida a las variaciones en la concentración de carga orgánica han sido documentadas tanto en sistemas de tratamiento de aguas residuales (García-Ruiz *et al.*, 2018) como en ambientes naturales (Attard *et al.*, 2011).

Una de las principales consecuencias de los aumentos de carga orgánica en los sistemas biológicos de eliminación de nitrógeno es la inhibición de la actividad nitrificante.

Esta inhibición es causada por la competencia por el oxígeno con las bacterias heterótrofas, las cuales tienen constantes de afinidad del oxígeno menores y mayores tasas de crecimiento que las bacterias nitrificantes (Geets *et al.*, 2006). García-Ruiz *et al.* (2018) observaron, en un sistema autótrofo de eliminación de nitrógeno, una reducción del 68% en la eliminación de nitrógeno cuando la DQO presentaba valores de 400mg/L.

### *Carga de amonio y fósforo*

Las concentraciones de amonio afluente en todas las EDAR fueron moderadas (entre 25 y 46 mg/L). En este trabajo para obtener un valor más representativo de la situación particular de cada una de las EDAR analizadas se utilizó la carga de amonio como variable ambiental. Esta variable determina la concentración de nitrógeno disponible para el crecimiento celular y el crecimiento de la biomasa nitrificante, por unidad de biomasa.

La carga de amonio afluente fue uno de los parámetros que mostró mayor variabilidad entre las EDAR analizadas durante el periodo de estudio. Las cargas más elevadas se observaron en el reactor CT1 ( $73,3 \pm 17,2$  gN/KgSSVLM) y las menores en el reactor ML ( $10,0 \pm 3,4$  gN/KgSSVLM).

La carga de amonio únicamente fue seleccionada como variable explicativa en los modelos de la EDAR ML y en el modelo de la EDAR QB, aunque en este último su contribución a la variabilidad explicada no resultó significativa.

Ha sido ampliamente demostrado que la concentración de amonio es un factor selectivo en la composición de la comunidad nitrificante. Sin embargo, estos resultados sugieren que, cuando los niveles de amonio en el afluente no son lo suficientemente elevados para inhibir las especies con constantes de semisaturación menores o influir en las que presentan baja afinidad por el sustrato, pueden coexistir y cooperar en la eliminación del amonio ambos tipos de estrategias. Resultados similares se han observado en el estudio de Limpiyakorn *et al.* (2011), donde algunas de las EDAR analizadas mostraron incoherencias en los niveles de amonio afluentes y las especies de BOA encontradas. En este estudio también se concluyó que la concentración de amonio en el afluente a la planta no es tan relevante como la concentración de amonio en los alrededores de los agregados celulares de bacterias nitrificantes. En este supuesto además de la concentración de amonio, influyen otros factores como el tamaño del flóculo, su compacidad y madurez,



pudiendo ser estas las razones por las que la carga de amonio no ha sido determinada como variable explicativa en la mayoría de los modelos, a pesar de su variabilidad.

En el DISTLM de la EDAR ML, donde se relacionan las abundancias de las muestras determinadas por FISH, la carga de amonio explicó un pequeño porcentaje de la varianza (5%) y presentó bajos coeficientes de correlación positivos con la abundancia de *Nitrosomonas*. El modelo, donde se analizaron conjuntamente los resultados de las 24 muestras analizadas con Illumina y sus muestras análogas analizadas por FISH, también reflejó la influencia de la carga de amonio en la dinámica poblacional de las BOA y las BON. En este modelo la carga de amonio aparece como la variable que mayor porcentaje de la varianza explica. La variación explicada se reparte entre los 2 primeros ejes del dbRDA. En el primero de ellos una combinación de carga elevada y elevada temperatura se relaciona con la abundancia del género *Nitrosomonas*. Sin embargo, una combinación de baja temperatura y baja carga de amonio se relaciona con la abundancia de *Nitrotoga*. En el segundo eje del dbRDA la carga de amonio comparte representación con la concentración de SSVLM. En este caso bajas concentraciones de SSVLM combinadas con mayores cargas de amonio, favorecen el crecimiento de *Nitrospira* y de los miembros del linaje *N. oligotropha*, mientras que las condiciones contrarias potenciaron el crecimiento de *Nitrotoga*. Estos resultados, junto con las bajas concentraciones de población nitrificante detectadas, los elevados TRC y la elevada concentración de SSLM sugieren que la nitrificación no es el único mecanismo de eliminación de nitrógeno en esta EDAR. En estos casos los análisis multivariantes respecto a los rendimientos de eliminación del nitrógeno pueden ayudar a esclarecer la situación.

La concentración de fósforo siguió el mismo patrón que la variable anterior. En este caso presentó, correlaciones bajas y positivas con el género *Nitrosomonas*, y bajas y negativas con el grupo de *Nitrosomonas* halotolerantes. La concentración de fósforo en el licor mezcla de la EDAR puede ser un factor limitante para el crecimiento de algunas especies. De este resultado se interpreta que, en presencia de mayores concentraciones de fósforo, *N. oligotropha* tiene mayor capacidad de crecimiento que las *Nitrosomonas* halotolerantes, que pueden ver disminuida su abundancia a favor del aumento de otras especies.

La nitrificación no es el único mecanismo de transformación del nitrógeno en las EDAR. Los nutrientes como nitrógeno y fósforo son asimilados por los organismos, para la síntesis de componentes celulares y el aporte de energía necesario para el metabolismo celular. Así mismo, es bien sabido que el carbono, el nitrógeno y el fósforo se asimilan en proporciones establecidas, como C: N: P - 100: 10: 1 para aguas residuales (Zhou y Gao, 2000).

La importancia de una correcta proporción de nutrientes para desarrollar al máximo las potencialidades de la biomasa habitante en un medio, ha sido documentada previamente. Los estudios de Tang *et al.* (2016, 2019) demostraron que la abundancia de los microorganismos del ciclo del nitrógeno se vio limitada por la concentración de fósforo. En su estudio más reciente (Tang *et al.*, 2019) observaron como la abundancia, la composición y la actividad de las bacterias nitrificantes y desnitrificantes en suelos mejoró tras la adición de ambos nutrientes, hasta conseguir una proporción adecuada a las necesidades nutricionales de los mismos.

Resultados similares se han observado en estudios de sistema de depuración, donde las poblaciones de BOA y BON aumentaron significativamente para mayores relaciones N/DQO (Yang *et al.*, 2004). La relación N/DQO ha sido indicada como un factor que influye en la abundancia de las bacterias nitrificantes, y en este caso además explicaría las bajas concentraciones de BOA y BON observadas en esta EDAR.

### *Sólidos suspendidos del licor mezcla*

La concentración de SSLM es una de las variables más importantes en el diseño y en la operación de los sistemas de fangos activos. Las EDAR analizadas presentaron concentraciones de sólidos variables. Entre ellas destacan las concentraciones de SSLM en la EDAR ML, las cuales fueron particularmente elevadas, con un promedio de 5047 mg/L y un valor máximo de 7569 mg/L. Así mismo el porcentaje de SSVLM, presentó un valor promedio del 87%, que es ligeramente superior al de referencia (80%). Tal y como se ha comentado anteriormente, estas elevadas concentraciones de sólidos son las responsables de las bajas cargas de amonio y fósforo observadas.

En la EDAR ML el porcentaje de SSVLM se correlacionó positivamente con la carga de amonio. Ambos parámetros se relacionaron con la abundancia del género

*Nitrosomonas* y negativamente con la del grupo de *Nitrosomonas* halotolerantes. Esta relación probablemente sea consecuencia del aumento de la población bacteriana asociado al aumento de la disponibilidad de amonio en el medio. El porcentaje de SSVLM hace referencia a la biomasa activa y además a otras sustancias volátiles presentes en el medio, por tanto, sería necesario una caracterización más precisa de esta variable para obtener conclusiones más precisas.

La concentración de sólidos también apareció como uno de los factores influyentes en la dinámica poblacional de las BOA y las BON, en el modelo realizado de manera conjunta para los resultados de FISH e Illumina. En este caso el modelo seleccionó la concentración de SSVLM como variable explicativa, que se relacionó de manera negativa con la carga de amonio en el sistema. Esta relación tiene sentido si se considera que, para una misma concentración afluente de amonio, su carga aumenta cuando existen menos sólidos en el sistema. Esta situación, al mismo tiempo, provocó un aumento de la tasa de crecimiento de determinadas especies como *N. oligotropha* y *Nitrospira*, probablemente por la existencia de mayor disponibilidad de nitrógeno en el sistema. La tendencia contraria fue observada para el género *Nitrotoga*. Estos resultados estarían en concordancia con los observados en el primer modelo realizado para la EDAR ML y permiten explicar la competencia entre los diferentes géneros de BN detectados en esta EDAR. *Nitrotoga* y las especies de *Nitrosomonas* halotolerantes fueron más competitivas para cargas de amonio menores, mientras que las nitrificantes del linaje *N. oligotropha* y *Nitrospira* presentaron la tendencia contraria.

## 5.2 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE LAS BACTERIAS NITRIFICANTES DETERMINADA MEDIANTE RESPIROMETRÍA

La respirometría es una herramienta fiable y sencilla para medir la actividad de las bacterias nitrificantes. Otras técnicas como FISH pueden aportar información sobre la actividad, ya que el contenido de ribosoma de las células hibridadas determina la intensidad de la fluorescencia. Por tanto, la cuantificación de la intensidad de la señal de hibridación puede ser una medida de las fluctuaciones en el contenido de ribosomas, que pueden indicar cambios en la actividad metabólica (Poulsen *et al.*, 1995). Sin embargo, estas observaciones deben interpretarse con cuidado, ya que cada sonda tiene unos niveles de

fluorescencia determinados, y la actividad metabólica y el contenido ribosomal no se correlacionan directamente en todas las especies bacterianas. Por ejemplo, algunas bacterias autótrofas de crecimiento lento, como las nitrificantes, mantienen altas concentraciones de ribosomas incluso si experimentan condiciones desfavorables (Wagner *et al.*, 1995). Es por ello, que las técnicas respirométricas representan una aproximación más fiable de la actividad nitrificante de los reactores biológicos, aunque no permiten discriminar entre las especies de BN que lo componen.

La actividad de las BN está influenciada por las variables ambientales y operacionales de planta, que a su vez influyen en la abundancia y composición de la comunidad biológica del fango activo. Valores más elevados de la OUR indican mayor actividad de la biomasa nitrificante, pero en el presente estudio no se ha observado una relación directa entre la SOUR<sub>N</sub> y AUR.

La tasa de respiración endógena promedio registrada en este estudio fue de 5,25 mgN/L h, que se encuentra dentro del rango descrito para sistema similares (Liu *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Yao *et al.*, 2017).

### 5.2.1 Relación de las variables respirométricas con las variables ambientales

El modelo donde se exploraron las relaciones entre las variables respirométricas y las variables ambientales correlacionó positiva y significativamente el aumento de temperatura y la disminución del porcentaje de SSVLM con el aumento de las OUR y SOUR de la biomasa heterótrofa. En esta relación la temperatura explicó mayor porcentaje de variabilidad. La combinación de variables contraria se relacionó negativa y moderadamente con Rsp. Estas relaciones podrían ser debidas a que el aumento de la temperatura contribuye a un aumento en el metabolismo de la biomasa heterótrofa de rápido crecimiento.

El segundo eje del dbRDA mostró que la combinación de elevadas cargas de PTs y elevado porcentaje SSVLM se relacionaron con mayores OUR de la biomasa autótrofa. Tal y como se ha relacionado en modelos anteriores, la disponibilidad de fósforo parece ser un factor que afecta a la comunidad nitrificante. El aumento de las concentraciones de

fósforo, probablemente alivia las limitaciones de crecimiento de estas bacterias y contribuye a la síntesis de EPS, que se traduce en un incremento de la actividad de las mismas, tal y como se refleja en los modelos. Estos resultados son acordes con los observados por varios autores en suelos con limitaciones de nutrientes, donde el aporte de nitrógeno y fósforo produjo un aumento en la actividad nitrificante y desnitrificante gracias a la mayor productividad de las enzimas relacionadas con estos procesos (Wang *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2019).

### 5.2.2 Relación de las bacterias nitrificantes con las variables respirométricas

En el modelo donde se exploran las relaciones entre las variables respirométricas y las variables ambientales, la OUR de las bacterias heterótrofas y la tasa de respiración máxima por nitrificación de las bacterias nitrificantes son consideradas como variables explicativas. Los coeficientes de correlación de ambas variables con los ejes del dbRDA mostraron una tendencia contraria, es decir las tasas más elevadas de OUR heterótrofa se correlacionaron con menores tasas de respiración máxima por nitrificación. Los coeficientes de correlación múltiple parcial determinados para las bacterias nitrificantes presentaron una correlación positiva con la  $R_s$  nitrificante y negativa con la OUR heterótrofa elevada en el caso del género *Nitrosomonas* y moderada en el caso del género *Nitrotoga*.

Las correlaciones entre la abundancia de los organismos nitrificantes y su potencial actividad nitrificante no han sido todavía dilucidadas (Pan *et al.*, 2018; Niu *et al.*, 2018), y son pocos los investigadores que han descrito una correlación directa entre la población de nitrificadores y la tasa de oxidación específica de amonio y nitrito, con la técnica FISH (Awolusi, 2016). Sin embargo, los resultados estadísticos obtenidos en el presente estudio indican, que las abundancias de las BN fueron consistentes con las tasas de respiración observadas, lo que valida las técnicas empleadas en este estudio. Estas observaciones son coincidentes con otros estudios donde se relacionó la dominancia funcional de la nitrificación y la dominancia numérica de los organismos oxidantes del amonio (Gao *et al.*, 2016). Yu *et al.* (2011), en un estudio en el que se emplea la técnica molecular FISH

observó una correlación directa entre la población de nitrificantes y la tasa específica de utilización de amonio y nitrito.

Las diferencias observadas en estos estudios pueden ser debidas a que, a diferencia de las bacterias de rápido crecimiento, el contenido de ARNr celular de las BOA en ocasiones no refleja realmente su actividad fisiológica, especialmente durante los períodos de estrés e inhibición (Witzig *et al.*, 2002). Por lo que en numerosas ocasiones la correlación de la población nitrificante con su actividad fisiológica puede estar sesgada.

### 5.3 ANÁLISIS DE LA BIOMASA ACTIVA MEDIANTE TÉCNICAS DE MEDICIÓN DE ATP DE SEGUNDA GENERACIÓN.

La monitorización del ATP tiene un alto interés ya que el ATP es la molécula implicada en el metabolismo de todas la células vivas. Esta molécula posibilita el intercambio de energía entre los procesos de anabolismo y catabolismo celular, así mismo es parte de la reserva energética de la célula. La cantidad de ATP celular puede traducirse como la cantidad de energía total que posee una célula para el mantenimiento celular y la síntesis de nuevas células y productos bioquímicos. La cantidad de ATP puede considerarse una medida directa de la biomasa viva. Sin embargo, su determinación no ha sido ampliamente utilizada en sistemas biológicos de depuración debido a las limitaciones que existían de la propia técnica, que han sido solucionadas con la evolución de los sistemas de detención (Whalen *et al.*, 2018).

Hasta la fecha son muy pocos los estudios que han utilizado esta aplicación para la monitorización de los procesos de tratamiento de aguas residuales (Lujan-Facundo *et al.*, 2018; Ferrer-Polonio *et al.*, 2017). En el estudio de Brault *et al.* (2011), en el cual se utilizaron redes neuronales para proporcionar una señal de alerta temprana de la aparición de bulking filamentoso, se escogió la medida del ATP como una variable predictiva que ayudó a mejorar el rendimiento del sistema.

Su aplicación se ha implementado también para la monitorización de sistemas de distribución (Vang *et al.*, 2014; Vital *et al.*, 2012), caracterización de aguas recuperadas (Lee *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017) y la monitorización de otros sistemas biológicos (Lauderdale *et al.*, 2012; Lautenschlager *et al.*, 2014; Fu *et al.*, 2019; Greenstein y Wert, 2019).

Las concentraciones de cATP determinadas en las 49 muestras de la EDAR ML mostraron valores muy variables, desde 2406 a 11900 ng/mL. Los valores habituales para reactores aerobios con sistema de eliminación de nutrientes han sido determinados en torno a los 2096 ng/mL (Whalen *et al.*, 2006). Este valor es inferior al determinado como valor promedio en las muestras analizadas en el presente estudio (5614 ng/mL). La diferencia entre estos valores puede ser debida a que la EDAR ML trabajó con concentraciones de SSLM más elevadas que los sistemas convencionales de fangos activos ( $5047 \pm 770$  mg /L) y a la evolución de las técnicas de cuantificación.

A partir del cATP se calculó la concentración de SSVAlM. Los valores determinados para esta nueva variables fueron un 47% menores que los valores correspondientes de SSVLM. Estos resultados son coherentes con la medidas esperadas tras los análisis mediante el kit QG21Waste™ de LuminUltra®. El ensayo convencional del los SSVLM mide la cantidad de sólidos volátiles presente en los fangos activos, que incluye una fracción variable de materia orgánica no biodegradable, sustancias poliméricas extracelulares y material orgánico procedente de la lisis celular. Esta determinación no solo incluye otras sustancias que no son materia celular, si no que tampoco permite distinguir entre biomasa viva y muerta. Es por ello que estas medidas pueden proporcionar información poco precisa sobre la cantidad de biomasa viable en los sistemas biológicos. Sin embargo, la medida del cATP hace referencia únicamente a la materia viva celular, por lo que su valor esperado es menor que el valor de los SSVLM. No obstante, las medidas de los SSVLM mostraron diferencias de hasta el 70%, que pone de manifiesto la importancia de utilizar técnicas más precisas, como el cATP, para el control de esta variable, ya que el error en su estimación puede llegar a ser muy elevado.

A pesar de que en la representación gráfica de los SSVLM respecto a los SSVAlM se observó una correlación, las medidas de dispersión de los datos fueron elevadas, lo que reafirma la hipótesis de que existe una fracción variable que no es biomasa que es incluida en su determinación.

No se observó una relación directa entre el BSI y la diferencia entre los SSVLM y los SSVAlM, lo que sustenta la hipótesis anterior. Tal y como se comentaba anteriormente, una correcta determinación de la biomasa activa en el sistema es de suma importancia para el diseño y el control de planta. La sobrestimación de este parámetro

puede llevar al cálculo erróneo de otros parámetros habitualmente usados para el control del proceso de depuración, como la CM, el TRC o las relaciones de nutrientes necesarias para el correcto funcionamiento del proceso.

En este estudio, además, se determinó un nuevo valor de la CM a partir de los SSVAlM. La nueva CM calculada ( $CM_{ATP}$ ) fue un 47% mayor que la CM calculada a partir de los SSVLM. La CM define la relación entre carga orgánica y microorganismos necesaria para una correcta operación del sistema. Como se observa en este estudio, las variaciones en la fracción de materia celular viva y materia celular muerta no son reflejadas mediante los procedimientos habituales para la estimación de la biomasa del sistema de depuración. Una determinación más precisa de este parámetro puede aportar mejoras sustanciales al control de proceso en las EDAR.

La introducción de esta variable en los modelos de interpretación ambiental no produjo una modificación significativa en los resultados, probablemente debido a que existen otros factores más relevantes influyendo en la matriz.

Se analizaron las relaciones entre las variables derivadas de la determinación del ATP respecto a las variables respirométricas. Los resultados del  $cATP$  no mostraron una relación directa con los valores de  $OUR_{end}$ . Se observó una relación entre el índice de estrés y los valores de la biomasa autótrofa. Esto podría ser debido a la mayor sensibilidad de esta biomasa a las variaciones del reactor, las cuales conducen a su rápida inhibición. En este estudio la medida del BSI aportó información sobre el estado del proceso de nitrificación y la actividad de la biomasa nitrificante. En el estudio de Lujan-Facundo *et al.* (2018), se observó una relación entre el aumento del BSI y el deterioro del rendimiento de eliminación de la DQO cuando aumentaron las conductividades del licor mezcla.

Además, el establecimiento de relaciones significativas de los SSVAlM puede proporcionar un parámetro de normalización más preciso en las mediciones de la tasa de respiración.



## 5.4 RENDIMIENTOS DE ELIMINACIÓN DEL NITRÓGENO Y SU RELACIÓN CON LA DINÁMICA POBLACIONAL DE LAS BACTERIAS NITRIFICANTES

### 5.4.1 Contribución de las poblaciones nitrificantes a la eliminación del amonio

La respuesta de las BN a los rendimientos de eliminación del nitrógeno fue evaluada en las diferentes EDAR analizadas con el objetivo de valorar su contribución a la eliminación del amonio. Diferentes poblaciones de BOA y BON pueden dar lugar a diferencias significativas en las tasas de nitrificación, y por tanto, en los rendimientos del proceso (Dytczak *et al.*, 2008).

Para valorar la contribución de las diferentes especies nitrificantes a la eliminación del amonio se utilizaron técnicas estadísticas de análisis multivariante. En las EDAR DN y CX no se pudo obtener un modelo parsimonioso (pocas variables con gran capacidad explicativa). En estos modelos la gran cantidad de varianza explicada es debida al mayor número de variables incluidas en el modelo pero que no presentan p-value significativos. En estas EDAR, por tanto, no se encontraron relaciones significativas entre la dinámica poblacional de las BN y los rendimientos de eliminación del nitrógeno.

Tal y como se ha comentado anteriormente, en la EDAR DN probablemente hubieron otros factores que contribuyeron a los buenos rendimientos de eliminación del nitrógeno, como los elevados tiempos de retención. Este sistema opera en régimen de oxidación total y puede que gran parte del nitrógeno se elimine por asimilación.

En la EDAR CT, los rendimientos de eliminación del NTs se asociaron con la abundancia de *Nitrosomonas* y el linaje de *N. oligotropha*, dentro de las BOA, y con la abundancia de *Nitrotoga*, que fue el género dominante de la oxidación del nitrito en esta EDAR. Este modelo también seleccionó el porcentaje de nitrito en el afluente como variable relacionada con la dinámica poblacional de las bacterias nitrificantes. El porcentaje NO<sub>2</sub> en el efluente se relacionó moderadamente con menores abundancias del género *Nitrotoga*.

En la EDAR QB la abundancia del género *Nitrosomonas* y el linaje de *N. oligotropha* presentaron una correlación significativa positiva con los rendimientos de eliminación del

NKTs, mientras que *Nitrospira* presentó una menor correlación, aunque también significativa.

En la EDAR ML las concentraciones de nitrato en el efluente del decantador secundario se relacionaron moderada y positivamente con la abundancia de *Nitrotoga*, y presentaron una correlación baja con *Nitrosomonas* y *N. oligotropha*, que fueron las especies dominantes.

Estudios previos han observado relaciones entre la abundancia de las BN y los rendimientos de eliminación de las diferentes fracciones del nitrógeno (Wang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2019), que confirman los resultados obtenidos.

Las relaciones observadas confirman una interacción y asociación ecológica entre las comunidades de BOA y BON en la eliminación del amonio, al igual que valida la metodología empleada en el presente estudio. Estos resultados manifiestan la importancia de la dinámica poblacional de las bacterias nitrificantes en los rendimientos de eliminación del amonio en las EDAR. Así mismo respaldan los resultados obtenidos por FISH y el proceso de cuantificación e identificación realizado. Demostrando que la técnica FISH es una herramienta útil y precisa para la monitorización de estas poblaciones en las EDAR.

#### 5.4.2 Análisis de los rendimientos respecto a las variables ambientales y biológicas

El análisis de los rendimientos de eliminación del nitrógeno respecto a las variables ambientales llevado a cabo mediante técnicas estadísticas de análisis multivariante permitió la construcción de modelos parsimoniosos con un elevado grado de variación explicada.

El modelo de la EDAR CT se discute en el apartado 5.5 “Influencia del ozono en los sistemas de eliminación de nutrientes”.

En la EDAR DN el aumento del porcentaje de tiempo que el OD se mantuvo entre 0,8 y 2 mg/L se relacionó con un aumento de la concentración de nitrito en el afluente y un aumento de NTs. Esta misma variable fue seleccionada por el modelo que explica la variación de las bacterias nitrificantes respecto a las variables ambientales, aunque no de manera significativa. En este caso se relacionó con la abundancia de *Nitrospira*, que a su vez aparece relacionada con la concentración de nitrato en el efluente. El aumento de las

concentraciones de oxígeno puede ser un factor relacionado con la abundancia y la actividad del género *Nitrospira*, que fue el género de NOB responsable de la oxidación del nitrito en esta EDAR.

La EDAR DN, durante el periodo de estudio, presentó unos rendimientos de eliminación de nitrógeno muy elevados y en un rango muy estrecho de valores. El DISTLM no aportó datos sobre cuáles son los factores relacionados con estos elevados rendimientos, pero sí permitió obtener información sobre los requerimientos de oxígeno para potenciar la oxidación del nitrito a nitrato, en los rangos de las condiciones de operación analizadas. La comunidad de BOA de esta EDAR presentó una dinámica compleja y variable, que pudo ser responsable de los elevados rendimientos observados. A pesar de ello, los elevados TRC registrados podrían ocasionar que gran parte del nitrógeno fuera eliminado por asimilación, sin embargo no existen suficientes evidencias para determinar su contribución. Los resultados de este estudio, sugieren que la estabilidad funcional no está necesariamente acompañada de una comunidad microbiana estable. Sin embargo, esto no significa que la dinámica de la comunidad microbiana no sea relevante para la estabilidad funcional. Gentile *et al.* (2007) evaluó la dinámica de la comunidad bacteriana en dos reactores con eliminación biológica de nitrógeno. En su estudio observó que durante el período de inestabilidad funcional, con altas concentraciones de nitratos en el efluente, la estructura de la comunidad cambió drásticamente, y que este hecho correlacionaba significativamente con las variables fisicoquímicas del efluente. En general, dinámicas moderadas de la comunidad microbiana, (necesarias para la adaptación de los organismos a las variaciones del entorno) en lugar de grandes cambios, son importantes para mantener el funcionamiento estable de los sistemas de tratamiento de aguas residuales (Miura *et al.*, 2007). Briones *et al.* (2003) indicaron que la estabilidad funcional no se determina por la estructura de la comunidad microbiana, pero está garantizada por la presencia de un reservorio de especies que pueden realizar la misma función ecológica. Estos resultados confirman observaciones realizadas por diferentes autores en sistemas de nitrificación (Daims *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012). Estos estudios apuntan que la existencia de una dinámica poblacional diversa, donde existen diversas especies de BOA o BON, frente a la presencia de un solo linaje de un grupo funcional, es la mejor manera de asegurar un buen sistema de nitrificación con elevados rendimientos, que

concuerta con las observaciones realizadas en esta EDAR, ya que, a pesar de tener oscilaciones significativas en las poblaciones de BOA los rendimientos de nitrificación siguen situándose en valores óptimos.

En la EDAR ML una combinación de elevadas temperatura y elevados porcentajes de SSVLM favorecieron la abundancia de las bacterias nitrificantes y los rendimientos de eliminación del nitrógeno total en esta EDAR. Esta situación puede ser debida a que estas condiciones, junto con los elevados TRC, provocan que la biomasa heterótrofa se mantenga en condiciones endógenas, como se deduce por sus bajas tasas de respiración endógena. En esta EDAR se observaron diferencias significativas entre los SSVLM y los SSVLM, por lo que el porcentaje de SSVLM no se puede traducir como un ameto directo de la biomasa activa del sistema. El aumento de las cargas de nitrógeno y fósforo se relacionaron moderadamente con el crecimiento de las bacterias nitrificantes, mientras se mantuvieron las condiciones de elevados SSVLM y elevados TRC. Estas condiciones también se relacionaron con las mayores  $R_s$  y  $SOUR_A$ . La baja concentración de biomasa nitrificante en esta EDAR probablemente fue debida a las bajas cargas de amonio, que limitaron su crecimiento.

*Nitrotoga* fue el género responsable de la oxidación del nitrito en esta EDAR. La abundancia y la actividad de *Nitrotoga* se vieron favorecidas con bajas temperaturas. Temperaturas más elevadas se relacionaron con un aumento de la actividad heterótrofa, tal y como se deduce por las mayores OUR observadas. Este aumento de actividad también permitió un aumento en el rendimiento de eliminación del nitrógeno total soluble. *Nitrotoga* no fue competitiva en estas condiciones. Una combinación de elevadas temperaturas y elevados porcentajes de SSVLM se relacionaron con mayores porcentajes de nitrito en el efluente y una menor concentración de nitrato a la salida, las cuales pueden ser consecuencia de la disminución de la actividad de *Nitrotoga*. En estas condiciones *Nitrospira* tampoco pareció aprovechar la disminución de *Nitrotoga* para crecer, probablemente debido a que sus bajas tasas de crecimiento no le permitieron competir con la biomasa heterótrofa. La disminución del nitrato relacionada con estas condiciones también podría ser debida a un aumento de la desnitrificación heterótrofa.

Los rendimientos de la EDAR QB fueron influenciados principalmente por la CM del sistema, el porcentaje de DQOs y el TRH en el decantador secundario. Cargas másicas

superiores a 0,2 kgDBO<sub>5</sub>/KgSSVLM se relacionaron con un deterioro de la calidad del efluente. Como se ha discutido anteriormente, CM elevadas desfavorecen la actividad de las BN de crecimiento lento debido a la competencia por el oxígeno con la biomasa heterótrofa. El aumento de la CM pareció afectar a la actividad de las BOA y las BON, como se deduce por la mayor concentración de amonio y nitrito en el efluente del decantador secundario.

Porcentajes de DQOs mayores del 47% y TRH en el decantador secundario menores de 6 horas se relacionaron con una disminución del nitrato en el efluente. Estos resultados, junto con el resto de modelos lineales multivariantes realizados para esta EDAR, sugieren que la carga orgánica fue el factor más influyente, ya que el porcentaje de DQOs también se relacionó con menores abundancias de la especies responsables de la eliminación del amonio en esta EDAR.

Los modelos realizados para la EDAR CX relativos a la variación de las poblaciones nitrificantes y su relación con las variables ambientales y los rendimientos del nitrógeno no han resultado significativos. En cambio el modelo realizado para analizar los rendimientos de eliminación del nitrógeno respecto a las variables ambientales fue capaz de explicar un 59,81% de la variabilidad. En este caso la cargas de fósforo mayores de 20 g/kgSSVLM d se relacionaron con menores rendimientos de eliminación del amonio y menores concentraciones de nitrato en el efluente. Esto podría ser debido a un mayor crecimiento de la biomasa heterótrofa cuando el aporte de fósforo es superior, que va en detrimento del crecimiento de la biomasa autótrofa de crecimiento lento. Esta situación sería contraria a la observada en la EDAR ML, ya que en este caso la biomasa del sistema no está en condiciones limitantes de nutrientes para el crecimiento de las bacterias heterótrofas.

## 5.5 INFLUENCIA DEL OZONO EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS DE ELIMINACIÓN DE NITRÓGENO

Las concentraciones de NT y el N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en el efluente fueron similares en ambos reactores de la EDAR CT. Estos parámetros variaron entre 20 y 54 mg/L y entre 4,4 y 45 mg/L respectivamente. Estos valores fueron el resultado de las bajas eficiencias de eliminación de nitrógeno observadas en la EDAR CT durante el periodo estudiado. Las

eficiencias de eliminación del NT y del  $\text{N-NH}_4^+$  variaron en un rango de 16 a 57% y de 10 a 90% respectivamente para CT1, mientras que estos valores para CT2 variaron entre 20 y 65% y entre 15 y 63%, respectivamente.

El análisis DISTLM utilizado para evaluar las correlaciones entre la población de bacterias nitrificantes y las variables ambientales, reveló que la dosificación de ozono no contribuyó al mayor porcentaje de varianza explicada, por tanto no se consideró una variable que afectara de manera significativa a la abundancia y composición de estas poblaciones.

El modelo para la interpretación de las relaciones entre los rendimientos de eliminación del nitrógeno y las bacterias nitrificantes mostró, que la variación en la estructura de la comunidad de bacterias nitrificantes se relaciona con el rendimiento del NTs. El dbRDA correlacionó el rendimiento del NTs con la abundancia relativa de *N. oligotropha* y *Nitrotoga*, que se corresponden con las BN dominantes en el periodo de estudio.

Existen pocos estudios que hayan monitorizado las poblaciones de bacterias nitrificantes mediante técnicas moleculares en sistemas biológicos de tratamiento con aplicación de ozono. En el estudio de Chen *et al.* (2017) se operaron dos reactores en serie para establecer un sistema de tratamiento combinado de ozono y reactor de membranas con lecho fijo. En este estudio se utilizó la secuenciación de alto rendimiento para evaluar la diversidad microbiana, determinando que *Nitrosospira* sp. y *Nitrospira* spp. fueron las especies responsables de la oxidación del amonio y del nitrito respectivamente, en ambos reactores previamente a la adición de ozono. Sin embargo, después de la adición de ozono, las poblaciones variaron significativamente; *Nitrobacter* sp. y *Nitrospira* coexistieron en el mismo reactor, pero la abundancia relativa de *Nitrospira* se redujo del 0,9 al 0,4% y del 1,8 al 0,5% en cada uno de los reactores a escala piloto. A pesar de este cambio el rendimiento de la eliminación de nitrógeno se mantuvo superior al 90%. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio indican que el ozono no tuvo impacto en la estructura de la comunidad nitrificante. Estos resultados están de acuerdo con los de Isazadeh *et al.* (2014). Estos autores investigaron los efectos de la aplicación de ozono en la estructura de la comunidad de bacterias nitrificantes en una planta piloto mediante secuenciación de alto rendimiento y FISH, observando que la estructura de la comunidad bacteriana permaneció muy similar durante el experimento a pesar del tratamiento con ozono. De estos resultados

se dedujo que otros factores ambientales como la composición del agua residual afluente y la temperatura podrían ser mas importantes respecto a la variación de la comunidad nitrificante.

Kondo *et al.* (2009) determinaron que la reducción en el rendimiento de eliminación de nitrógeno fue debida a la competencia por el OD entre las bacterias nitrificantes y las heterótrofas, cuando la carga orgánica fue mayor debido al aumento de la concentración de ozono. Sin embargo, en ambos reactores de la EDAR CT el OD fue mantenido por encima de 0,8 mg/L la mayor parte del tiempo. De manera que esta teoría no explicaría la reducción en la eficiencia de eliminación de nitrógeno observada y el aumento de la concentración de amonio en el efluente cuando las concentraciones de ozono fueron mayores.

Levén *et al.* (2016) evaluaron el efecto de bajas dosis de ozono para controlar *M. parvicella* en la estructura de la comunidad bacteriana nitrificante en una planta a escala real. En este estudio no se encontraron variaciones relevantes en la composición o abundancia de la comunidad bacteriana nitrificante para las diferentes dosis de ozono probadas (4,4 – 6,6 gO<sub>3</sub>/KgSSLM). En su estudio, el rendimiento de la eliminación de nitrógeno no se vio afectado por la aplicación de ozono, probablemente debido a otros factores que equilibran los efectos potenciales del ozono.

Cabe resaltar que aunque el ozono fue el factor principal que influyó en los rendimientos de la eliminación de amonio en la EDAR CT, no se encontró ninguna correlación significativa con la abundancia de la comunidad de bacterias nitrificantes. Esto implica que el impacto del ozono en la estructura de las bacterias nitrificantes no explicaría los bajos rendimientos de eliminación de nitrógeno observados en el sistema. Una de las razones por las que no se han encontrado relaciones puede ser el mecanismo de protección que estas bacterias desarrollan para protegerse de compuestos tóxicos. Es bien sabido que las nitrificantes forman compactos agregados que les proporciona protección frente a los depredadores e inhibidores. Se ha sugerido que esta agregación puede ser la respuesta de la comunidad nitrificante al estrés (de Boer *et al.*, 1991). Spieck *et al.* (2006) observaron que el género *Nitrospira* presentó resistencia más alta a determinados antibióticos que el género *Nitrobacter*. Esta resistencia podría ser explicada por la tendencia de agregación de *Nitrospira* en los flóculos densos embebidos en una matriz de EPS, que le ofrece protección frente a

inhibidores como el ozono. Yan *et al.* (2009b) observaron que con una dosis alta de ozono (80 mg O<sub>3</sub>/g SS), algunas bacterias gram negativas, identificadas en las EDAR en tétradas o grupos, eran capaces de resistir el estrés oxidativo del ozono. Estos resultados implican que la presencia de una matriz de EPS puede proteger a las bacterias nitrificantes contra el efecto oxidativo. Este mecanismo explicaría la ausencia de impacto en la estructura de la población nitrificante y la baja reducción de las actividades de nitrificación debido a la solubilización de EPS por la adicción de ozono.

## 5.6 COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD DE BACTERIAS NITRIFICANTES SEGÚN METAGENÓMICA

### 5.6.1 Secuenciación mediante la plataforma Illumina

Las técnicas de secuenciación de alto rendimiento como Illumina o PacBio aportan novedosos conocimientos sobre la microbiota de las EDAR, ya que hasta el momento la mayoría de los microorganismos presentes en los sistemas de depuración aguas residuales no podido ser cultivados (Rodríguez *et al.*, 2015).

La secuenciación del gen 16S rRNA mediante la tecnología Illumina fue realizada en 24 muestras de la EDAR ML. Esta técnica determinó que los principales filos presentes en los fangos activos de la EDAR ML fueron *Proteobacteria* (40%), *Bacteroidetes* (14%), *Chloroflexi* (11%), *Actinobacteria* (9%) y *Planctomycetes* (8%). La composición a nivel de género fue similar durante el periodo analizado. Se han obtenido resultados similares en estudios previos en sistemas de fangos activos donde *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Chloroflexi* fueron los filos más abundantes, (Wang *et al.*, 2012; Ferrera y Sánchez, 2016; Liu *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2017), siendo el filo *Proteobacteria* el más abundante en todos ellos. *Proteobacteria* es el filo más común de especies funcionales en el tratamiento de aguas residuales (He *et al.*, 2015; Ye *et al.*, 2012). El filo *Bacteroidetes*, representa uno de los grupos heterótrofos más abundantes en ambientes marinos (Dorador *et al.*, 2009). Este filo ha sido relacionado con la degradación de la materia orgánica particulada, especialmente los compuestos de alto peso molecular. Los datos de este estudio también son coincidentes con otros que han documentado que el filo *Chloroflexi* representaba del 2 al 17% de la comunidad bacteriana en EDAR con sistemas de fangos activos (Hu *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2015).



Miembros de este *filo* se ha detectado en aguas residuales hipersalinas y ambientes marinos (Breuker *et al.*, 2013; He *et al.*, 2015). El *filo Chloroflexi* se encuentran comúnmente en los sedimentos y participan en el ciclo del carbono, la fijación de CO<sub>2</sub> y la fermentación (Xu *et al.*, 2017). Así mismo, *Chloroflexi* se adapta a las condiciones variables de las EDAR debido a su flexibilidad metabólica. El *filo Actinobacteria* también ha sido identificado como uno de los más abundantes en los sistemas de tratamiento de aguas residuales. Este *filo* resultó el segundo más abundante en un sistema Bardenpho (Xue *et al.*, 2019), probablemente debido a que los miembros de *Actinobacteria* han sido identificados como importantes PAO, además algunos pueden estar involucrados en la desnitrificación (Kawakoshi *et al.*, 2012; Martín *et al.*, 2006). En el estudio de García-Ruiz *et al.*, 2018 los *filos Proteobacterias* (38%) y *Planctomycetes* (45%) fueron los más abundantes en un sistema CANON con biofiltro, operado sin materia orgánica.

A nivel de clase *Gammaproteobacteria* (19%) y *Betaproteobacteria* (8%) fueron las más abundantes dentro de las proteobacterias. Las betaproteobacterias han sido identificadas como las principales responsables de la eliminación de nutrientes orgánicos (Wells *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2017).

A nivel de género, a partir de los datos obtenidos con Illumina, *Candidatus Competibacter* fue el más abundante (11%). Este género se ha relacionado con la degradación de la materia orgánica y con la síntesis de bioplásticos a partir de polihidroxialcanoatos (PHA) sintetizados por *Competibacter* (Bengtsson *et al.*, 2008). Esto estaría en coherencia con las bajas cargas de fósforo observadas en esta EDAR, que no permiten que se desarrolle una comunidad biológica relacionadas con el ciclo del P, que esté en competencia con este género.

La secuenciación mediante Illumina permitió investigar la abundancia y diversidad de BOA y BON. Los resultados detectaron la presencia de los dos géneros de BOA en la EDAR ML, *Nitrosomonas* y *Nitrosospira*. *Nitrosospira* únicamente fue detectado en 3 de las 24 muestras analizadas en abundancias relativas muy bajas (0,01%).

Estudios anteriores han indicado que las BOA en las EDAR están principalmente representadas por los género *Nitrosomonas* y *Nitrosospira*. En el estudio de Siripong y Rittman (2007) se observó que una combinación de baja temperatura y elevados TRC favorecieron el crecimiento de *Nitrosospira* sp. Sin embargo, *Nitrosomonas* suele ser más abundante que

*Nitrospira* en sistemas de tratamiento de aguas residuales (Wagner *et al.*, 1996), particularmente en aquellos sistemas con mayor contenido de nitrógeno amoniacal (Wang *et al.*, 2016, Hu *et al.*, 2017). El género *Nitrosomonas* ha sido previamente identificado mediante Illumina como el género dominante en los sistemas de eliminación biológica de amonio (Terada *et al.*, 2013; González-Martínez *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2015).

Las concentraciones de BOA detectadas en este estudio con Illumina presentaron bajas abundancias relativas. Esta observación es consistente con estudios previos (Zhang *et al.*, 2011; Phan *et al.*, 2016). En estos estudios se apunta a que posiblemente *Nitrosomonas* tiene una alta actividad de transcripción a pesar de la baja abundancia en los fangos activos, ya que al igual que en este caso, los sistemas investigados presentaron eliminaciones de amonio adecuadas.

Illumina identificó el género *Nitrospira* como el dominante en la oxidación del nitrito en la EDAR ML. Los géneros *Nitrotoga* y *Nitrobacter* también fueron detectados, aunque este último en un número muy reducido de muestras.

*Nitrospira* ha sido previamente identificada mediante Illumina como el género dominante en la oxidación del nitrito en EDAR (Ma *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016). En el estudio de Liu *et al.* (2016) se operó un sistema de laboratorio para determinar los efectos de la limitación de oxígeno en la población de BN. Las concentraciones determinadas fueron 1,06 y 5,22 % para *Nitrosomonas* y *Nitrospira*, respectivamente. Estas concentraciones son superiores a las determinadas en este estudio, particularmente para la concentración de NOB. No obstante como se ha visto en los análisis FISH de este estudio, las concentraciones de BN fueron particularmente bajas respecto a otras EDAR analizadas.

### 5.6.2 Secuenciación mediante la plataforma PacBio y comparativa de las técnicas moleculares para la identificación y cuantificación de poblaciones microbianas

Las investigaciones sobre la composición de la comunidad bacteriana en sistemas de tratamiento de aguas realizadas mediante secuenciación PacBio SMRT son muy escasas. Este es el primer estudio donde se analiza la microbiota de un sistema de fangos activos mediante la secuenciación PacBio SMRT. Entre las principales razones, por las que esta

técnica se ha aplicado en menor medida para la caracterización de la microbiota en estos sistemas, está el elevado coste este tipo de secuenciación. En el artículo de Quail *et al.*, 2012, se puede encontrar información detallada de los costes y tiempos de secuenciación de cada uno de estos sistemas. El número mínimo de lecturas no quiméricas y de alta calidad obtenidas mediante Illumina por muestra fue de 22050. Este valor para la secuenciación PacBio fue de 2853 lecturas, lo que supone un 12% de las lecturas realizadas mediante Illumina. Estas lecturas representan un promedio del 79,5% de las lecturas totales obtenidas en Illumina y un 96,5% para la secuenciación mediante PacBio.

Los resultados obtenidos mediante la plataforma PacBio determinaron que *Proteobacteria* fue el *filo* más abundante. Estos resultados coinciden con los obtenidos mediante la plataforma Illumina. Sin embargo, la abundancia relativa de este *filo* detectada por PacBio, ha sido mayor que la obtenida mediante la plataforma Illumina. Estos sesgos en la abundancia de las poblaciones bacterianas son debidos a que el número de lecturas obtenidas mediante la plataforma PacBio es menor que las obtenidas mediante la tecnología Illumina. Esto provoca una sobreestimación de las lecturas obtenidas durante la secuenciación PacBio.

Una de las principales ventajas de la secuenciación PacBio es la capacidad de obtener lecturas de gran longitud que abarcan fragmentos genómicos de decenas de miles de pares de bases. Estas secuencias son muy útiles especialmente para el ensamblaje de novo sin embargo, reducen significativamente el rendimiento de la secuenciación. Mientras que la secuenciación Illumina produce un elevado número de secuencias cortas, en la secuenciación mediante PacBio se obtienen un menor número de lecturas de mayor longitud. Es por ello que, los análisis realizado con PacBio mostraron una comunidad compuesta por una menor riqueza que los de Illumina. Sin embargo, debido a la mayor longitud de la lecturas obtenidas, la asignación taxonómica se mejora considerablemente mediante PacBio y permite una resolución taxonómica mejor a nivel de especie.

A nivel de *filo* el porcentaje de secuencias no asignadas mediante Illumina fue del 4%, mientras que para PacBio fue del 0%. Los resultados obtenidos también fueron diferentes en cuanto a su distribución. En la mayoría de muestras analizadas con Illumina el segundo *filo* en abundancia fue *Bacteroidetes*, mientras que en la secuenciación mediante PacBio este género ocupó el cuarto lugar. El *filo Firmicutes* ocupó el octavo lugar en

abundancia relativa en las muestras secuenciadas mediante Illumina y el segundo con PacBio. La secuenciación de muestras de ML con PacBio distinguió 5 filos diferentes con una abundancia superior al 1% y la secuenciación con Illumina 11.

En ambas técnicas, al profundizar en el nivel taxonómico aumenta el número de OTUs no asignadas. A nivel de género el porcentaje de OTUs no asignadas fue del 28 % para Illumina y del 0,6% en PacBio. La composición de los géneros más abundantes según ambas técnicas fue muy dispar en todas las muestras analizadas. PacBio determinó el género *Thauera* como el más abundante (36% en promedio), mientras que este género presentó una abundancia promedio del 0,68% en las muestras analizadas mediante Illumina, en ningún caso mayor al 2%. El género *Thauera* se ha identificado en numerosas ocasiones en sistemas de fangos activos y sistemas de depuración de soporte fijo (Babatsouli *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2016; García-Ruíz *et al.*, 2018). *Thauera* es uno de los principales géneros involucrados en la desnitrificación y la degradación de materia orgánica en los sistemas de tratamiento de aguas residuales. El género *Zooglea* fue identificado como el segundo género más abundante mediante esta técnica (14%) y fue el tercer género más abundante según Illumina (3%), aunque sus abundancias relativas fueron diferentes.

Como se ha comentado anteriormente, la secuenciación PacBio SMRT gracias a la mayor longitud de las lecturas permite profundizar en la asignación taxonómica. PacBio permite la caracterización a nivel de especie mientras que Illumina únicamente permite, en general, una caracterización a nivel de género. La secuenciación con PacBio resulta interesante cuando se pretende caracterizar en profundidad una comunidad bacteriana, como es el caso de la comunidad nitrificante en este estudio.

La secuenciación mediante PacBio aportó datos acerca de la composición a nivel de especie de la comunidad de bacterias nitrificantes en las muestras analizadas. La plataforma PacBio permitió profundizar en la composición de las BOA y, coincidiendo con la otras técnicas moleculares, detectó el género *Nitrosomonas* como el dominante en las muestras analizadas. El género *Nitrospira*, detectado mediante Illumina no fue detectado con PacBio. La secuenciación de las muestras de ML con PacBio permitió la identificación de las especies *N. marina* y *N. aestuarii*. Como se había apuntado en el apartado “5.1.1 Dinámica poblacional de las bacterias oxidantes del amonio” estas especies podrían ser las

componentes del grupo de *Nitrosomonas* halotolerantes hibridadas mediante la sonda NEU. La secuenciación PacBio no identificó *N. oligotropha* entre las especies de BOA, mientras que la técnica FISH sí permitió su identificación.

Los resultados determinaron la presencia de los dos géneros importantes de NOB *Nitrotoga* y *Nitrospira*. Las especies identificadas dentro del género *Nitrospira* se correspondieron con *Candidatus Nitrospira defluvi*, perteneciente al linaje I de *Nitrospira*, y *Nitrospira* cf. *moscoviensis* perteneciente al linaje II de *Nitrospira*. Ambas especies han sido identificadas previamente en sistemas de depuración de aguas residuales (Chai *et al.*, 2019; Chiellini *et al.*, 2013). *Ca. Nitrospira defluvi* presenta actividades máximas mayores que *N. moscoviensis*, (Nowka *et al.* 2015). Las especies del linaje I suelen ser más abundantes que las del linaje II en sistemas con elevadas concentraciones de nitrito (Maixner *et al.*, 2006).

Otro de los factores importantes para obtener una buena caracterización de las muestras a analizar es la base de datos usada como referencia para la asignación de OTUs. Las secuencias obtenidas con Illumina se han enfrentado a Silva 128 porque Greengenes no se actualiza regularmente, como si ocurre con Silva.

Respecto a las abundancias obtenidas, las principales diferencias detectadas se observaron en la muestra 1, donde el porcentaje de *Nitrospira* con PacBio fue del 6% y menor del 1% con Illumina y FISH. Debido al menor número de lecturas las poblaciones determinadas con PacBio pueden ser sobreestimadas. Por ello, es necesario la aplicación de técnicas como FISH que permitan corregir el sesgo de estas aplicaciones. Otra de las diferencias significativas detectadas fue el mayor porcentaje de *Nitrosomonas* detectado por FISH en las muestras ML con una abundancia relativa del 2%, mientras que con las otras dos técnicas (Illumina y PacBio) la abundancia no superó el 1%.

El análisis estadístico reveló una buena correlación entre los análisis FISH y los análisis realizados mediante Illumina para la cuantificación. Este resultado indica que las aproximaciones metagenómicas pueden ser una buena herramienta para caracterizar las poblaciones nitrificantes.

La técnica de secuenciación PacBio permitió la identificación de grupos que no habían sido detectados con los métodos moleculares anteriores, profundizando en el conocimiento sobre la diversidad de las poblaciones nitrificantes. A pesar de ello, tal y

como se deduce de los análisis realizados, caracterizar con precisión una comunidad bacteriana sigue siendo una tarea compleja, que requiere de muchos recursos y la combinación de diferentes aproximaciones moleculares, tal y como se realiza para optimizar las técnicas de ensamblaje de nuevos genomas (Mahmoud *et al.*, 2017).

## 6. Conclusiones

---





- 1) El linaje *N. oligotropha* ha sido identificado como el dominante en la oxidación de amonio en todas las EDAR analizadas. Los géneros responsables de la oxidación del nitrito fueron *Nitrospira* en las EDAR CX, DN y QB y *Nitrotoga* en los reactores CT1 y CT2. La fracción de biomasa nitrificante varió entre el 1 y 10%, en una relación BOA:BON mayoritaria de 2:1.
- 2) La secuenciación mediante la plataforma Illumina permitió la identificación de diferentes géneros de bacterias nitrificantes. Las OTUs de BOA detectadas se asignaron a los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrospira*. Los géneros de BON detectados fueron *Nitrospira*, *Nitrotoga* y *Nitrobacter*.
- 3) La secuenciación SMRT de PacBio permitió la asignación de diferentes especies de bacterias nitrificantes. Las BOA detectadas, que pertenecieron al género *Nitrosomonas*, se asignaron a las especies *Nitrosomonas marina*, *Nitrosomonas* sp. y *Nitrosomonas aestuarii*. Dentro del grupo de las BON se detectaron las especies *Nitrospira* sp., *Candidatus Nitrospira*, *Candidatus Nitrospira defluvii*, *Nitrospira moscoviensis* y *Candidatus Nitrotoga*.
- 4) Se observaron diferencias significativas en la variación de las comunidades nitrificantes debidas al factor espacial. Se observó una agrupación entre las muestras de los reactores CT1 y CT2 y entre las muestras de QB y DN. Las muestras que presentaron mayor disimilitud fueron las de la EDAR CX. No se observaron diferencias significativas en la variación de las comunidades nitrificantes debidas al factor estacional.
- 5) Los modelos de regresión lineal múltiple multivariante basados en la distancia (DISTLM-dbrDA) determinaron que en la EDAR QB las abundancias del género *Nitrosomonas* spp. y *N. oligotropha* se relacionaron con %DQOs menores del 50%. En la EDAR DN la abundancia relativa de *Nitrospira* mostró una tendencia a aumentar cuando el OD del reactor se mantuvo entre de 0,8 y 2 mgO<sub>2</sub>/L más del 33% del tiempo. En esta EDAR la abundancia de *N. oligotropha* y *Nitrobacter* spp. se asoció a valores de CM superiores a 0,15 KgDBO<sub>5</sub>/KgSSVLM·d. En la EDAR ML *Nitrosomonas* spp. se relacionó positivamente con %SSVLM superiores al 87%. En esta EDAR el género *Nitrotoga* se relacionó con temperaturas menores a 23°C. No se encontraron relaciones significativas entre la población de bacterias nitrificantes y las variables ambientales y operacionales de las EDAR CT y CX.
- 6) Los rendimientos de eliminación del nitrógeno y los componentes del nitrógeno en el efluente mostraron diferencias significativas debidas al factor espacial. Las mayores diferencias se observaron entre la EDAR DN y los reactores CT1, CT2 y CX, mientras que la menor separación se observó entre CX y QB. No se observaron diferencias significativas en la variación de los rendimientos de eliminación del nitrógeno y los componentes del nitrógeno del efluente debidas al factor estacional.

- 7) Los modelos de regresión lineal múltiple multivariante basados en la distancia (DISTLM-dbrDA) construidos para las EDAR DN, ML, CT y QB demuestran la contribución mutualista de las BOA y BON a la eliminación del amonio en las EDAR analizadas. En la EDAR DN concentraciones de  $\text{N-NO}_3^-$  en el efluente superiores a 4 mgN/L se relacionaron positivamente con el género *Nitrospira* y negativamente con grupo de *Nitrosomonas* halotolerantes. En la EDAR QB la abundancia de *Nitrosomonas* spp. se relacionó positivamente con rendimientos de eliminación del nitrógeno Kjeldahl soluble superiores al 75%.
- 8) Los modelos de regresión lineal múltiple multivariante basados en la distancia (DISTLM-dbrDA) construidos para determinar las relaciones entre los rendimientos del nitrógeno y las variables ambientales explicaron un porcentaje de varianza muy elevado. En la EDAR QB valores de la carga másica superiores a 0,2 kgDBO5/kgSSVLM se relacionaron con menores rendimientos de eliminación del amonio y del nitrógeno total soluble. En la EDAR CX cargas de fósforo superiores a 20 mgP/gSSVLM se relacionaron con menores rendimientos de eliminación de las diferentes fracciones del nitrógeno. En la EDAR ML temperaturas menores de 23°C y porcentajes de SSVLM entre 85-82% se relacionaron con la aparición de  $\text{N-NO}_3^-$  y NT en el efluente. En la EDAR ML la abundancia de los géneros *Nitrotoga* sp. y *Nitrosomonas* spp. se asoció a valores mayores de 3 mg/L de  $\text{N-NO}_3^-$ .
- 9) En la EDAR CT la aplicación de ozono no pareció ser un factor determinante en la estructura de las poblaciones nitrificantes. Sin embargo, la concentración de ozono fue la variable operacional más relacionada con los bajos rendimientos de eliminación de amonio observados.
- 10) La abundancia de la población de bacterias nitrificantes se relacionó con la actividad nitrificante determinada por respirometría. La abundancia relativa de los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrotoga* se relacionó negativamente con las tasas de respiración endógena de las bacterias heterótrofas y positivamente con la tasa de respiración máxima por nitrificación.
- 11) Las tasas de respiración endógena global y de la biomasa heterótrofa se relacionaron positivamente con temperaturas mayores de 23 °C. La tasa de respiración endógena de la biomasa autótrofa se relacionó con cargas de fósforo superiores a 1 mgP/Kg SSVLM y porcentajes de SSVLM mayores del 85%.
- 12) Los valores de los SSVLM determinados de manera convencional fueron, en promedio, un 47% mayores que los SSVLM, estos resultados realzan la importancia de utilizar técnicas más precisas para el control de esta variable.
- 13) La CMATP presentó valores superiores a la CM, siendo la diferencia promedio entre estas dos variables del 46%. El índice de estrés de la biomasa (BSI), calculado a partir

de la diferencia entre el ATP celular y el ATP total, explicó un 49,3% de la variación de la tasa de respiración endógena de la biomasa autótrofa, la tasa máxima de respiración por nitrificación y sus respectivas tasas específicas. La relación observada indicó que la actividad de la biomasa nitrificante se redujo cuando el BSI fue más elevado.

- 14) La secuenciación mediante la plataforma Illumina permitió obtener un mayor número de lecturas que la secuenciación SMRT de PacBio, aportando mayor información sobre la diversidad a nivel de género. La mayor longitud de las lecturas obtenidas mediante PacBio permitió una mejor asignación taxonómica a nivel de especie. Se observó una correlación entre las muestras analizadas mediante FISH e Illumina, las cuales permitieron detectar las sobreestimaciones en la abundancia de ciertas especies determinada según la secuenciación PacBio.



## 7. Difusión de resultados

---



## **PUBLICACIONES EN REVISTAS**

Barbarroja, P., Zornoza, A., Aguado, D., Borrás, L., & Alonso, J. L. (2019). A multivariate approach of changes in filamentous, nitrifying and protist communities and nitrogen removal efficiencies during ozone dosage in a full-scale wastewater treatment plant. *Environmental Pollution*. [doi:10.1016/j.envpol.2019.06.068](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.068)

Alonso, J. & Barbarroja, P. (2019) Improved in situ hybridization efficiency of ammonia-oxidizing bacteria with locked-nucleic-acid-incorporated DNA probe. *Applied Microbiology and Biotechnology*. (Enviado).

## **PUBLICACIONES EN CONGRESOS**

Analysis of nitrifying microbial communities by FISH and 16S rRNA amplicon-based sequencing in a wastewater treatment plant, Barbarroja, P., Alonso, J., Pérez, R., Zornoza, A., Lardín, C., Pastor, L., Morales E. *VII International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology* (BioMicroWorld 2017).

Environmental ordination of nitrifying bacterial community dynamics in wastewater treatment plants. Barbarroja, P., Zornoza, A., Borrás, L., Aguado, D., Alonso, J., *VII International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology* (BioMicroWorld 2017).

Comparison of nitrifying microbial communities of two full-scale membrane bioreactors treating wastewaters from municipal solid wastes using 16S rDNA gene amplicon sequencing. Barbarroja, P., Moreno, L., Zornoza, A., Fernández, J., Alonso, J., Muñagorri, F., García, C. Alvarez, C. *7th Congress of European Microbiologists* (FEMS 2017).

Effect of ozone addition to control *Gordonia* foaming on the nitrifying bacterial communities in a municipal wastewater treatment plant. Barbarroja, P., Zornoza, A., Alonso, J., ; Marin, S. *7th Congress of European Microbiologists* (FEMS 2017).

## **PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN SUBVENCIONADOS EN CONVOCATORIAS PÚBLICAS**

AYUDA PERSONAL TECNICO DE APOYO INFRAESTRUCTURAS MINECO-BARBARROJA ORTIZ (PTA2014-09555-I). MINISTERIO DE ECONOMIA Y EMPRESA.

**PARTICIPACIÓN EN CONTRATOS DE INVESTIGACIÓN CON EMPRESAS  
Y/O ADMINISTRACIONES**

INFLUENCIA DE LAS VARIABLES OPERACIONALES Y FISICOQUIMICAS EN LA  
DINAMICA Y ESTRUCTURA DE LA POBLACION DE BACTERIAS NITRIFICANTES EDAR  
MOLINA-ALGUAZAS UTE.



## Referencias

---



## A

- Agustina, T. E., Ang, H. M., & Vareek, V. K. (2005). A review of synergistic effect of photocatalysis and ozonation on wastewater treatment. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 6, 264-273.
- Alawi, M., Lipski, A., Sanders, T., & Spieck, E. (2007). Cultivation of a novel cold-adapted nitrite oxidizing betaproteobacterium from the Siberian Arctic. *The ISME journal*, 1(3), 256.
- Alawi, M., Off, S., Kaya, M., & Spieck, E. (2009). Temperature influences the population structure of nitrite-oxidizing bacteria in activated sludge. *Environmental microbiology reports*, 1(3), 184-190.
- Alonso J L, Borrás L, Amorós I. Improved in situ hybridization efficiency of nitrifying bacteria with locked-nucleic-acid incorporated DNA probe. ASPD5 IWA Int. Specialised Conference on Microbial Population Dynamics in Biological Wastewater Treatment; 2009 May 24-25; Aalborg, Denmark.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215, 403-410.
- Amann, R., Fuchs, B.M., Beherens, S. (2001). The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 231–236.
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., & Stahl, D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environmental Microbiology*, 56, 1919-1925.
- Ambardar, S., Gupta, R., Trakroo, D., Lal, R., Vakhlu, J. (2016). High throughput sequencing: an overview of sequencing chemistry. *Indian Journal of Microbiology*, 56, 394- 404.
- Amplicon P.C.R. 2013. 16S metagenomic sequencing library preparation. Preparing 16S ribosomal RNA gene amplicons for the Illumina MiSeq system. [https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry\\_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf](https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf) (consultado 11/06/2018)
- 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.
- 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. (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.
- Andrews JH, Harris RF. (1986). r- and K-selection and microbial ecology. *Advances in Microbial Ecology* 9:99 – 147.
- Annavaiahala, M. K., Kapoor, V., Santo-Domingo, J., & Chandran, K. (2018). Comammox functionality identified in diverse engineered biological wastewater treatment systems. *Environmental Science & Technology Letters*, 5, 110-116.
- APHA, AWWA, WEF, (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21st ed. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington, D.C.

- Archibald, F.; Méthot, M.; Young, F.; Paice, M. G. (2001). A Simple System to Rapidly Monitor Activated Sludge health and performance. *Water Research*, 35, 2543–2553.
- Arciero D, Balny C, Hooper AB (1991) Spectroscopic and rapid kinetic studies of reduction of cytochrome c554 by hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas europaea*. *Biochem* 30:11466–11472.
- Arretxe, M., Heap, J.M., Christofi, N., (1997). The effect of toxic discharges on ATP content in activated sludge. *Environmental Toxicology and Water Quality*. 12, 23–29
- Attard, E., Recous, S., Chabbi, A., De Berranger, C., Guillaumaud, N., Labreuche, J., Philippot, L., Schmid, B., Le Roux, X., (2011). Soil environmental conditions rather than denitrifier abundance and diversity drive potential denitrification after changes in land uses. *Global Change Biology*. 17, 1975–1989.

## B

- Babatsouli, P., Palogos, I., Michalodimitraki, E., Costa, C., & Kalogerakis, N. (2015). Evaluation of a MBR pilot treating industrial wastewater with a high COD/N ratio. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 90, 26-33.
- Bai Y, Sun Q, Wen D et al (2012) Abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in industrial and domestic wastewater treatment systems. *FEMS Microbial Ecology*, 80:323–330
- Beman, J. M., Popp, B. N., & Francis, C. A. (2008). Molecular and biogeochemical evidence for ammonia oxidation by marine Crenarchaeota in the Gulf of California. *The ISME Journal*, 2(4), 429.
- Bengtsson, S., Werker, A., & Welander, T. (2008). Production of polyhydroxyalkanoates by glycogen accumulating organisms treating a paper mill wastewater. *Water Science and Technology*, 58, 323-330.
- Berglund, E.C., Kiialainen, A., Syvänen, A.C. (2011). Next-generation sequencing technologies and applications for human genetic history and forensics. *Investig Genet*, 2: 23.
- Blackburne R, Vadivelu VM, Yuan Z, Keller J. (2007). Kinetic characterisation of an enriched *Nitrospira* culture with comparison to *Nitrobacter*. *Water Research*, 41, 3033–3042.
- Bock, E., Wagner, M. (2001) Oxidation of inorganic nitrogen compounds as an energy source. In: Dworkin H et al (eds) *The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community*, release 3:7, 3rd edn. Springer-Verlag, New York.
- Bock E., Koops H.-P., Ahlers B., Harms H. (1992) Oxidation of inorganic nitrogen compounds as energy source. in *The prokaryotes*, eds Balows H., Trüper H. G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.-H. (Springer Verlag, New York, N.Y), 2nd ed. pp 414–430.
- Böhler, M., Siegrist, H., (2004). Partial ozonation of activated sludge to reduce excess sludge, improve denitrification and control scumming and bulking. In: *Water Science and Technology*, 49, 41-49.
- Bollmann A, Laanbroek HJ (2001) Continuous culture enrichments of ammonia-oxidizing bacteria at low ammonium concentrations. *FEMS Microbiol Ecol* 37, 211–221.
- Borrás, L., (2008). Técnicas microbiológicas aplicadas a la identificación y cuantificación de organismos presentes en sistemas EBPR. Tesis. Valencia: Universitat Politècnica de València.
- Bothe, H., Jost, G., Schloter, M., Ward, B. B., & Witzel, K. P. (2000). Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS microbiology reviews*, 24(5), 673-690.
- Brault, J. M., Labib, R., Perrier, M., & Stuart, P. (2011). Prediction of activated sludge filamentous bulking using ATP data and neural networks. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 89(4), 901-913.
- Bray, J.R., and Curtis., J.T., (1957) Ordination of the upland forest community of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 27, 325-349.

Breker, A., Stadler, S., & Schippers, A. (2013). Microbial community analysis of deeply buried marine sediments of the New Jersey shallow shelf (IODP Expedition 313). *FEMS microbiology ecology*, 85, 578-592.

Briones A, Raskin L (2003) Diversity and dynamics of microbial communities in engineered environments and their implications for process stability. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 270–276.

## C

Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunencko, T., Zaneveld, J., Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high- throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7, 335-336.

Caravelli, A., Giannuzzi, L., & Zaritzky, N., (2006). Effect of ozone on filamentous bulking in a laboratory scale activated sludge reactor using respirometry and INT-dehydrogenase activity. *Journal of Environmental Engineering*, 132, 1001-1010.

Chai, H., Xiang, Y., Chen, R., Shao, Z., Gu, L., Li, L., & He, Q. (2019). Enhanced simultaneous nitrification and denitrification in treating low carbon-to-nitrogen ratio wastewater: treatment performance and nitrogen removal pathway. *Bioresource Technology*, 280, 51-58.

Chao, Y., Mao, Y., Yu, K., & Zhang, T. (2016). Novel nitrifiers and comammox in a full-scale hybrid biofilm and activated sludge reactor revealed by metagenomic approach. *Applied microbiology and biotechnology*, 100, 8225-8237.

Chen, J., Liu, S., Yan, J., Wen, J., Hu, Y., & Zhang, W., (2017). Intensive removal efficiency and mechanisms of carbon and ammonium in municipal wastewater treatment plant tail water by ozone oyster shells fix-bed bioreactor– membrane bioreactor combined system. *Ecological Engineering*, 101, 75-83.

Chen, G. H., and Wong, M. T. (2004). Impact of increased chloride concentration on nitrifying-activated sludge cultures. *Journal of Environmental Engineering*, 130, 116–125.

Cheng, J. y Liu, B. (2001) Nitrification/denitrification in intermittent aeration process for swine wastewater treatment. *Journal of Environmental Engineering*, 127, 705–711.

Chiellini, C., Munz, G., Petroni, G., Lubello, C., Mori, G., Verni, F., & Vannini, C. (2013). Characterization and comparison of bacterial communities selected in conventional activated sludge and membrane bioreactor pilot plants: a focus on Nitrospira and Planctomycetes bacterial phyla. *Current microbiology*, 67, 77-90.

Claesson, M. J., O'Sullivan, O., Wang, Q., Nikkilä, J., Marchesi, J. R., Smidt, H., ... & O'Toole, P. W. (2009). Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *PloS one*, 4, e6669.

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.

Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., ... & Tiedje, J. M. (2008). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic acids research*, 37(suppl\_1), D141-D145.

Cornfield, J., y Tukey, J.W. (1956) Average values of mean squares in factorials. *Annals of Mathematical Statistics* 27, 907-949.

- Costa, E., Pérez, J., & Kreft, J. U. (2006). Why is metabolic labour divided in nitrification?. *Trends in microbiology*, 14(5), 213-219.
- Cydzik-Kwiatkowska, A. (2015). Bacterial structure of aerobic granules is determined by aeration mode and nitrogen load in the reactor cycle. *Bioresource technology*, 181, 312-320.
- Cydzik-Kwiatkowska, A., ZIELIŃSKA, M., & WOJŃOWSKA-BARYŁA, I. (2012). Impact of operational parameters on bacterial community in a full-scale municipal wastewater treatment plant. *Polish Journal of Microbiology*, 61, 41-49.

## D

- Daims, H., Lücker, S., & Wagner, M. (2016). A new perspective on microbes formerly known as nitrite-oxidizing bacteria. *Trends in microbiology*, 24, 699-712.
- Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., ... & Kirkegaard, R. H. (2015). Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*, 528(7583), 504
- Daims, H., Taylor, M. W., & Wagner, M. (2006). Wastewater treatment: a model system for microbial ecology. *Trends in biotechnology*, 24, 483-489.
- Daims H, Nielsen JL, Nielsen PH, Schleifer KH, Wagner M. (2001a). In situ characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl Environ Microbiol* 67:5273–5284.
- Daims H, Purkhold U, Bjerrum L, Arnold E, Wilderer PA, Wagner M (2001b) Nitrification in sequencing biofilm batch reactors: lessons from molecular approaches. *Water Science Technology* ,43, 9–18.
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K. H., & Wagner, M. (1999). The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and applied microbiology*, 22, 434-444.
- Dalzell DJ, Christofi N; (2002) An ATP luminescence method for direct toxicity assessment of pollutants impacting on the activated sewage sludge process. *Water Research*, 6, 1493-1502
- De Boer W., Gunnewiek PGAK., VeenhuiS M., Bock E., Laanbroek HJ., (1991). Nitrification at low pH by aggregated chemolithotrophic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 3600–3604
- Dionisi HM, Layton AC, Harms G, Gregory IR, Robinson KG, Saylor GS (2002) Quantification of *Nitrosomonas oligotropha*—like ammonia-oxidizing bacteria and *Nitrospira* spp. from full-scale wastewater treatment plants by competitive PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 245–253
- Di Trapani, D., Mannina, G., & Viviani, G. (2018). Membrane Bioreactors for wastewater reuse: Respirometric assessment of biomass activity during a two year survey. *Journal of Cleaner Production*, 202, 311-320.
- Dorador, C., Meneses, D., Urtuvia, V., Demergasso, C., Vila, I., Witzel, K. P., & Imhoff, J. F. (2009). Diversity of Bacteroidetes in high-altitude saline evaporitic basins in northern Chile. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 114(G2).
- Dytczak, M. A., Londry, K. L., Siegrist, H., & Oleszkiewicz, J. A., (2007). Ozonation reduces sludge production and improves denitrification. *Water research*. 41, 543-550.
- Dytczak, M.A., Oleszkiewicz, J.A., (2008). Performance change during long-term ozonation aimed at augmenting denitrification and decreasing waste activated sludge. *Chemosphere* 73, 1529-1532.

## E

- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27, 2194-2200.

Ehrich S, Behrens D, Lebedeva E, Ludwig W, Bock E. (1995). A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship. *Archives of Microbiology*, 164, 16–23.

Eid, J., A. Fehr, J. Gray, K. Luong, J. Lyle, G. Otto, P. Peluso, D. Rank, P. Baybayan, B. Bettman, A. Bibillo, K. Bjornson, B. Chaudhuri, F. Christians, R. Cicero, S. Clarks, R. Dalal, A. Dewinter, J. Dixon, M. Foquet, A. Gaertner, P. Hardenbol, C. Heiner, K. Hester, D. Holden, G. Kearns, X. Kong, R. Kuse, Y. Lacroix, S. Lin, P. Lundquist, C. Ma, P. Marks, M. Maxham, D. Murphy, I. Park, T. Pham, M. Phillips, J. Roy, R. Sebra, G. Shen, J. Sorenson, A. Tomaney, K. Travers, M. Trulson, J. Vieceli, J. Wegener, D. Wu, A. Yang, D. Zaccarin, P. Zao, F. Zhong, J. Korlach y S. Turner, (2009). Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science*. 323, 133-138.

## F

Fan, X. Y., Gao, J. F., Pan, K. L., Li, D. C., & Dai, H. H. (2017). Temporal dynamics of bacterial communities and predicted nitrogen metabolism genes in a full-scale wastewater treatment plant. *RSC Advances*, 7(89), 56317-56327.

Federhen, S. (2011). The NCBI taxonomy database. *Nucleic acids research*, 40(D1), D136-D143.

Ferrer-Polonio, E., Fernández-Navarro, J., Alonso-Molina, J. L., Amorós-Muñoz, I., Bes-Piá, A., & Mendoza-Roca, J. A. (2017). Changes in the process performance, sludge production and microbial activity in an activated sludge reactor with addition of a metabolic uncoupler under different operating conditions. *Journal of environmental management*, 203, 349-357.

Figuerola ELM, Erijman L (2010) Diversity of nitrifying bacteria in a full-scale petroleum refinery wastewater treatment plant experiencing unstable nitrification. *Journal of Hazardous Materials*, 181, 281–288.

Franzen, O., Hu, J., Bao, X., Itzkowitz, S.H., Peter, I., Bashir, A., (2015). Improved OTU- picking using long-read 16S rRNA gene amplicon sequencing and generic hierarchical clustering. *Microbiome* 3, 43.

Freitag, A., Rudert, M., & Bock, E. (1987). Growth of *Nitrobacter* by dissimilatoric nitrate reduction. *FEMS Microbiology Letters*, 48, 105-109.

Fu, J., Lee, W. N., Coleman, C., Nowack, K., Carter, J., & Huang, C. H. (2019). Removal of pharmaceuticals and personal care products by two-stage biofiltration for drinking water treatment. *Science of The Total Environment*, 664, 240-248.

Fuchs, B.M., Sytsubo, K., Ludwig, W., Amann, R. 2001. In situ accessibility of *Escherichia coli* 23S rRNA to fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Applied Environmental Microbiology*, 67, 961-968.

## G

Ganigué, R., López, H., Balaguer, M. D., & Colprim, J. (2007). Partial ammonium oxidation to nitrite of high ammonium content urban landfill leachates. *Water research*, 41, 3317-3326.

Gao, P., Xu, W., Sontag, P., Li, X., Xue, G., Liu, T., & Sun, W. (2016). Correlating microbial community compositions with environmental factors in activated sludge from four full-scale municipal wastewater treatment plants in Shanghai, China. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(6), 4663-4673.

Gao, J., Luo, X., Wu, G., Li, T., & Peng, Y. (2014). Abundance and diversity based on *amoA* genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in ten wastewater treatment systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 98, 3339-3354.

- Gao, X. Y., Xu, Y., Liu, Y., & Liu, Z. P. (2012). Bacterial diversity, community structure and function associated with biofilm development in a biological aerated filter in a recirculating marine aquaculture system. *Marine Biodiversity*, 42, 1-11.
- García-Ruiz, M. J., Maza-Márquez, P., González-López, J., & Osorio, F. (2018). Nitrogen removal capacity and bacterial community dynamics of a Canon biofilter system at different organic matter concentrations. *Chemosphere*, 193, 591-601.
- Gardoni, D., Ficara, E., Fornarelli, R., Parolini, M., Canziani, R., 2011. Long-term effects of the ozonation of the sludge recycling stream on excess sludge reduction and biomass activity at full-scale. *Water Science and Technology*, 63, 2032-2038.
- Geets J, de Cooman M, Wittebolle L, Heylen K, Vanparys B, et al. (2007) Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75, 211–221.
- Geets, J., Boon, N., & Verstraete, W. (2006). Strategies of aerobic ammonia-oxidizing bacteria for coping with nutrient and oxygen fluctuations. *FEMS microbiology ecology*, 58, 1-13.
- Gentile, M. E., Jessup, C. M., Nyman, J. L., & Criddle, C. S. (2007). Correlation of functional instability and community dynamics in denitrifying dispersed-growth reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 680-690.
- Gerardi, M. (2002). *Nitrification and denitrification in the activated sludge process*. Wiley- Interscience. Nueva York. Estados Unidos. Grady.
- Gieseke, A., Bjerrum, L., Wagner, M., Amman, R. (2003) Structure and activity of multiple nitrifying bacterial populations co-existing in a biofilm. *Environmental Microbiology* 5, 355-369.
- Gieseke, A., Purkhold, U., Wagner, M., Amann, R., Schramm, A., (2001). Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphate-removing biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1351–1362.
- Gilbride, K. A., Lee, D. Y., & Beaudette, L. A. (2006). Molecular techniques in wastewater: understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. *Journal of microbiological methods*, 66, 1-20.
- Gommers, K., De Wever, H., Brauns, E., & Peys, K. (2007). Recalcitrant COD degradation by an integrated system of ozonation and membrane bioreactor. *Water science and technology*, 55, 245-251.
- González, P., Quintans, P., Vizcaíno, M., Miguel, R., González, J., Pérez, J y García, R. (2010). Estudio de la inhibición del proceso de nitrificación como consecuencia de la acumulación de metales en el fango biológico de la EDAR de León y su alfoz. *Tecnología del Agua*. 322: 28-38.
- Gonzalez-Martinez, A., Osorio, F., Morillo, J. A., Rodriguez-Sanchez, A., Gonzalez-Lopez, J., Abbas, B. A., & van Loosdrecht, M. C. (2015). Comparison of bacterial diversity in full scale anammox bioreactors operated under different conditions. *Biotechnology progress*, 31, 1464-1472.
- Gonzalez-Martinez, A., Pesciaroli, C., Martínez-Toledo, M. V., Hontoria, E., González-López, J., & Osorio, F. (2014). Study of nitrifying microbial communities in a partial-nitritation bioreactor. *Ecological engineering*, 64, 443-450.
- González- Martínez, A., Calderón, K., Albuquerque, A., Hontoria, E., González-López, J., Guisado, I. M., & Osorio, F. (2013). Biological and technical study of a partial-SHARON reactor at laboratory scale: effect of hydraulic retention time. *Bioprocess and biosystems engineering*, 36, 173-184.



- González-Martínez, A., M Poyatos, J., Hontoria, E., Gonzalez-Lopez, J., & Osorio, F. (2011). Treatment of effluents polluted by nitrogen with new biological technologies based on autotrophic nitrification-denitrification processes. *Recent patents on biotechnology*, 5, 74-84.
- Gordon, A. (2009). FASTX-Toolkit: FASTQ/A short-reads pre-processing tools. Cold spring harbor laboratory, cold spring harbor, NY. [http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/)
- Gould, S. J., Keller, G. A., & Subramani, S. (1988). Identification of peroxisomal targeting signals located at the carboxy terminus of four peroxisomal proteins. *The Journal of cell biology*, 107, 897-905.
- Gower, J.C. (1966) Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika* 53, 325-338.
- Greenstein, K. E., & Wert, E. C. (2019). Using rapid quantification of adenosine triphosphate (ATP) as an indicator for early detection and treatment of cyanobacterial blooms. *Water research*, 154, 171-179.

## H

- Handelsman, J. (2002). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 669–685.
- Harms G, Layton AC, Dionisi HM, Gregory IR, Garrett VM, Hawkins SA, Robinson KG, Saylor GS (2003) Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Environmental Science & Technology*, 37, 343–351.
- Hartley, H.O. (1967) Expectations, variances and covariances of ANOVA mean squares by 'synthesis'. *Biometrics* 23, 105-114.
- He, S., Niu, Q., Li, Y.-Y., Nie, Y., Hou, M., (2015). Factors associated with the diversification of the microbial communities within different natural and artificial saline environments. *Ecological Engineering*, 83, 476–484.
- Head, I. M., Hiorns, W. D., Embley, T. M., McCarthy, A. J., & Saunders, J. R. (1993). The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *Microbiology*, 139, 1147-1153.
- Hellinga, C. S. A. A. J. C., Schellen, A. A. J. C., Mulder, J. W., van Loosdrecht, M. V., & Heijnen, J. J. (1998). The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. *Water science and technology*, 37, 135-142.
- Hence, M., Harremoës, P., la Cour Jansen, J., and Arvin, E. (1997) *Wastewater Treatment*. Berlin.: Springer-Verlag.
- Hollocher, T. C., Tate, M. E., & Nicholas, D. J. (1981). Oxidation of ammonia by *Nitrosomonas europaea*. Definite <sup>18</sup>O-tracer evidence that hydroxylamine formation involves a monooxygenase. *Journal of Biological chemistry*, 256, 10834-10836.
- Holm-Hansen, O. (1970). ATP Levels in Algal Cells as Influenced by Environmental Conditions. *Plant and Cell Physiology*.
- Hong, S., Bunge, J., Leslin, C., Jeon, S., Epstein, S.S. (2009). Polymerase chain reaction primers miss half of rRNA microbial diversity. *ISME Journal*, 3, 1365–1373.
- Hooper, A. B., Vannelli, T., Bergmann, D. J., & Arciero, D. M. (1997). Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 71, 59-67.

- Hoshino, T., Yilmaz, L. S., Noguera, D. R., Daims, H., & Wagner, M. (2008). Quantification of target molecules needed to detect microorganisms by fluorescence in situ hybridization (FISH) and catalyzed reporter deposition-FISH. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 5068-5077.
- Hotelling, H. (1933) Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *British Journal of Educational Psychology* 24, 417-441.
- Hu, D., Zhou, Z., Niu, T., Wei, H., Dou, W., Jiang, L. M., & Lv, Y. (2017). Co-treatment of reject water from sludge dewatering and supernatant from sludge lime stabilization process for nutrient removal: A cost-effective approach. *Separation and Purification Technology*, 172, 357-365.
- Huang Z, Gedalanga PB, Asvapathanagul P et al (2010) Influence of physicochemical and operational parameters on Nitrobacter and Nitrospira communities in an aerobic activated sludge bioreactor. *Water Research*, 44, 4351–4358.
- Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2008). Microbiology: metagenomics. *Nature*, 455(7212), 481.
- Hugenholtz, P., & Pace, N. R. (1996). Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends in biotechnology*, 14, 190-197.

## I

- Isazadeh, S., Ozcer, P. O., & Frigon, D. (2014). Microbial community structure of wastewater treatment subjected to high mortality rate due to ozonation of return activated sludge. *Journal of applied microbiology*, 117, 587-596.
- Ishii, K., Fujitani, H., Soh, K., Nakagawa, T., Takahashi, R., & Tsuneda, S. (2017). Enrichment and physiological characterization of a cold-adapted nitrite-oxidizing *Nitrotoga* sp. from an eelgrass sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 83, e00549-17.

## 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.
- 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.
- Jetten, M. S., Niftrik, L. V., Strous, M., Kartal, B., Keltjens, J. T., & Op den Camp, H. J. (2009). Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 44, 65-84.
- Juretschko S, Timmermann G, Schmid M, Schleifer KH, Pommerening- Röser A, Koops HP, Wagner M. (1998). Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3042–3051.

## K

- Kalyuzhnaya, M.G., Lapidus, A., Ivanova, N., Copeland, A.C., McHardy, A.C., Szeto, E., Salamov, A., Grigoriev, I.V., Suciú, D., Levine, S.R., Markowitz, V.M., Rigoutsos, I., Tringe, S.G., Bruce, D.C., Richardson, P.M., Lidstrom, M.E., Chistoserdova, L. 2008. High-resolution metagenomics targets specific functional types in complex microbial communities. *Nature Biotechnology*, 26, 1029-1034.
- Kalyuzhnyi, S., Gladchenko, M., Mulder, A., & Versprille, B. (2006a). New anaerobic process of nitrogen removal. *Water science and technology*, 54, 163-170.

- Kalyuzhnyi, S., Gladchenko, M., Mulder, A., & Versprille, B. (2006b). DEAMOX—new biological nitrogen removal process based on anaerobic ammonia oxidation coupled to sulphide-driven conversion of nitrate into nitrite. *Water research*, 40, 3637-3645.
- Kayee, P., Sonthiphand, P., Rongsayamanont, C., & Limpiyakorn, T. (2016a). Archaeal " amoA" Genes Outnumber Bacterial" amoA" Genes in Municipal Wastewater Treatment Plants in Bangkok. *Microbial ecology*, 72, 262-262.
- Kayee, P., Rongsayamanont, C., Kunapongkiti, P., & Limpiyakorn, T. (2016). Ammonia half-saturation constants of sludge with different community compositions of ammonia-oxidizing bacteria. *Environmental Engineering Research*, 21, 140-144.
- Kawakoshi, A. Katsuki., Nakazawa, Hidekazu Fukada, Junji Sasagawa, Machi., Katano, Yoko Nakamura, Sanae., ... & Kamagata, Yoichi (2012). Deciphering the genome of polyphosphate accumulating actinobacterium *Microlunatus phosphovor*. *DNA research*, 19, 383-394.
- Ke X, Angel R, Lu Y, Conrad R. (2013). Niche differentiation of ammonia oxidizers and nitrite oxidizers in rice paddy soil. *Environmental Microbiology*, 15, 2275–2292.
- Kim, D. y Kim, S. (2006). Effect of nitrite concentration on the distribution and competition of nitrite-oxidizing bacteria in nitrification reactor systems and their kinetic characteristics. *Water Research*. 40, 887-894.
- Kim, J.K., Park, K.J., Cho, K.S., Nam, S.W., Park, T.J., Bajpai, R., 2005. Aerobic nitrification-denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains. *Bioresource Technology*, 96, 1897–1906.
- Kitzinger, K., Koch, H., Lückner, S., Sedlacek, C. J., Herbold, C., Schwarz, J., ... & Leisch, N. (2018). Characterization of the First "Candidatus Nitrotoga" Isolate Reveals Metabolic Versatility and Separate Evolution of Widespread Nitrite-Oxidizing Bacteria. *Mbio*, 9(4), e01186-18.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*, 41(1), e1-e1.
- Koops, H. P., Böttcher, B., Möller, U. C., Pommerening-Röser, A., & Stehr, G. (1990). Description of a new species of *Nitrosococcus*. *Archives of Microbiology*, 154, 244-248.
- Kondo, T., Tsuneda, S., Ebie, Y., Inamori, Y., & Xu, K. (2009). Improvement of nutrient removal and phosphorus recovery in the anaerobic/oxic/anoxic process combined with sludge ozonation and phosphorus adsorption. *Journal of Water and Environment Technology*, 7, 135-142.
- Könneke, M., Schubert, D. M., Brown, P. C., Hügler, M., Standfest, S., Schwander, T., ... & Berg, I. A. (2014). Ammonia-oxidizing archaea use the most energy-efficient aerobic pathway for CO<sub>2</sub> fixation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 8239-8244.
- Kruse, M., Zumbärgel, S., Bakker, E., Spieck, E., Eggers, T., & Lipski, A. (2013). The nitrite-oxidizing community in activated sludge from a municipal wastewater treatment plant determined by fatty acid methyl ester-stable isotope probing. *Systematic and applied microbiology*, 36, 517-524.
- Kuypers, M. M., Marchant, H. K., & Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 16, 263.
- Kyriakides A.L.; Costello S.M; Easter M.C and Jhonson I. (1991). Rapid Hygiene monitoring using ATP bioluminescence. *Bioluminescence and Chemiluminescence: Current Status*. Eds.P.E Stanley and L.J Kricka. Chichester John Wiley and Sons.pp 519-522

## L

- Laanbroek, H.J., Bodelier, P.L.E., Gerards, S., (1994). Oxygen consumption kinetics of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter hamburgensis* grown in mixed continuous cultures at different oxygen concentrations. *Archives of Microbiology*, 161, 156–162.
- Labrenz, M., Sintes, E., Toetzke, F., Zumsteg, A., Herndl, G. J., Seidler, M., & Jürgens, K. (2010). Relevance of a crenarchaeotal subcluster related to *Candidatus Nitrosopumilus maritimus* to ammonia oxidation in the suboxic zone of the central Baltic Sea. *The ISME journal*, 4, 1496.
- Lackner S., Gilbert E.M., Vlaeminck S.E., Joss A., Horn H. and van Loosdrecht M.C.M. (2014), Full-scale partial nitrification/anammox experiences—an application survey, *Water Research*, 55, 292–303.
- Lasken, R. S., & McLean, J. S. (2014). Recent advances in genomic DNA sequencing of microbial species from single cells. *Nature Reviews Genetics*, 15, 577.
- Lauderdale, C., Chadik, P., Kirisits, M. J., & Brown, J. (2012). Engineered biofiltration: Enhanced biofilter performance through nutrient and peroxide addition. *Journal-American Water Works Association*, 104 E298-E309.
- Lautenschlager, K., Hwang, C., Ling, F., Liu, W. T., Boon, N., Köster, O., ... & Hammes, F. (2014). Abundance and composition of indigenous bacterial communities in a multi-step biofiltration-based drinking water treatment plant. *Water research*, 62, 40-52.
- Lee, Y., Imminger, S., Czekalski, N., Von Gunten, U., & Hammes, F. (2016). Inactivation efficiency of *Escherichia coli* and autochthonous bacteria during ozonation of municipal wastewater effluents quantified with flow cytometry and adenosine tri-phosphate analyses. *Water research*, 101, 617-627.
- Legendre, P., y Legendre, L. (1998) *Numerical Ecology*. Amsterdam: El sevier Science BV, 853 pp.
- Lehninger A. L. (1982) *Principles of Biochemistry, Part II*, 1011 pp. Worth Pubs. Inc., New York, USA.
- Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W., Prosser, J.I., Schuster, S.C., Schleper, C., (2006). Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442, 806-809.
- Levén L, Wijnbladh E, Tuveesson M, (2016). Control of *Microthrix parvicella* and sludge bulking by ozone in a full-scale WWTP. *Water Science & Technology*, 73, 866-872.
- Levin, G. V.; Schrot, J. R.; Hess, W. C. (1975) Methodology for application of adenosine triphosphate determination in wastewater treatment. *Environmental Science & Technology*, 9, 961–965.
- Li, G. Q., Yu, T., Wu, Q. Y., Lu, Y., & Hu, H. Y. (2017). Development of an ATP luminescence-based method for assimilable organic carbon determination in reclaimed water. *Water research*, 123, 345-352.
- Limpiyakorn, T., Sonthiphand, P., Rongsayamanont, C., & Polprasert, C. (2011). Abundance of *amoA* genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in activated sludge of full-scale wastewater treatment plants. *Bioresource technology*, 102, 3694-3701.
- Limpiyakorn, T., Kurisu, F., Sakamoto, Y., and Yagi, O. (2007). Effects of ammonium and nitrite on communities and populations of ammonia-oxidizing bacteria in laboratory-scale continuous-flow reactors. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60, 501–512
- Limpiyakorn, T., Shinohara, Y., Kurisu, F., and Yagi, O. (2005). Communities of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of various sewage treatment plants in Tokyo. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54, 205–217.

- Liu, Y., Ngo, H. H., Guo, W., Peng, L., Pan, Y., Guo, J., ... & Ni, B. J. (2016). Autotrophic nitrogen removal in membrane-aerated biofilms: Archaeal ammonia oxidation versus bacterial ammonia oxidation. *Chemical Engineering Journal*, 302, 535-544.
- Liu, G., & Wang, J. (2012). Probing the stoichiometry of the nitrification process using the respirometric approach. *Water research*, 46, 5954-5962.
- Logares, R., Sunagawa, S., Salazar, G., Cornejo-Castillo, F.M., Ferrera, I., Sarmiento, H., Hingamp, P., Ogata, H., de Vargas, C., Lima-Mendez, G., Raes, J., Poulain, J., Jaillon, O., Wincker, P., Kandels-Lewis, S., Karsenti, E., Bork, P., Acinas, S.G. 2014. Metagenomic 16S rDNA illumina tags are a powerful alternative to amplicon sequencing to explore diversity and structure of microbial communities. *Environmental Microbiology*, 16, 2659-2671.
- Lücker, S., Schwarz, J., Gruber-Dorninger, C., Spieck, E., Wagner, M., & Daims, H. (2015). Nitrotoga-like bacteria are previously unrecognized key nitrite oxidizers in full-scale wastewater treatment plants. *The ISME journal*, 9, 708.
- Lücker S, Wagner M, Maixner F, Pelletier E, Koch H, Vacherie B, Rattei T, Sinnighe Damsté J, Spieck E, Le Paslier D, Daims H. (2010). A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 13479 –13484.
- Luján-Facundo, M. J., Fernández-Navarro, J., Alonso-Molina, J. L., Amorós-Muñoz, I., Moreno, Y., Mendoza-Roca, J. A., & Pastor-Alcañiz, L. (2018). The role of salinity on the changes of the biomass characteristics and on the performance of an OMBR treating tannery wastewater. *Water research*, 142, 129-137.
- ## M
- Ma, Q., Qu, Y., Shen, W., Zhang, Z., Wang, J., Liu, Z., ... & Zhou, J. (2015). Bacterial community compositions of coking wastewater treatment plants in steel industry revealed by Illumina high-throughput sequencing. *Bioresource Technology*, 179, 436-443.
- Maeng S K; , Choi B G; Lee K.T, , Song K.G.(2013). Influences of solid retention time, nitrification and microbial activity on the attenuation of pharmaceuticals and estrogens in membrane bioreactors . *Wat Res.* 47: 3151 -3162
- Mahmoud, M., Zywicki, M., Twardowski, T., & Karlowski, W. M. (2017). Efficiency of PacBio long read correction by 2nd generation Illumina sequencing. *Genomics*.
- Maixner F, Noguera DR, Anneser B, Stoecker K, Wegl G, Wagner M, Daims H. (2006). Nitrite concentration influences the population structure of *Nitrospira*-like bacteria. *Environmental Microbiology*, 8, 1487–1495.
- Manser, R., Gujer, W., Siegrist, H., (2005). Consequences of mass transfer effects on the kinetics of nitrifiers. *Water Research*, 39, 4633–4642.
- Martens-Habbena, W., Stahl, D.A., (2011). Nitrogen metabolism and kinetics of ammonia- oxidizing archaea. *Methods Enzymol.* 496, 465–487.
- Martens-Habbena, W., Berube, P.M., Urakawa, H., de la Torre1, J.R., Stahl, D.A., (2009). Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying archaea and bacteria. *Nature* 461, 976–981.
- Martin, H. G., Ivanova, N., Kunin, V., Warnecke, F., Barry, K. W., McHardy, A. C., ... & Dalin, E. (2006). Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities. *Nature biotechnology*, 24, 1263.

- 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.
- Meng, X., Liu, D., Yang, K., Song, X., Zhang, G., Yu, J., ... & Li, K. (2013). A full scale anaerobic–anoxic–aerobic process coupled with low-dose ozonation for performance improvement. *Bioresource technology*, 146, 240-246.
- Mercier, C., Boyer, F., Bonin, A., & Coissac, E. (2013, November). SUMATRA and SUMACLUSt: fast and exact comparison and clustering of sequences. In *Programs and Abstracts of the SeqBio 2013 workshop*. Abstract (pp. 27-29).
- Metzker, M.L. 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*, 11, 31-46.
- Miura Y, Hiraiwa MN, Ito T, Itonaga T, Watanabe Y, et al. (2007) Bacterial community structures in MBRs treating municipal wastewater: Relationship between community stability and reactor performance. *Water Res* 41: 627–637.
- Mobarry, B. K., Wagner, M., Urbain, V., Rittmann, B. E., & Stahl, D. A. (1996). Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(6), 2156-2162.
- Mota, C., Head, M. A., Ridenoure, J. A., Cheng, J. J., and de los Reyes, F. L. (2005). Effects of aeration cycles on nitrifying bacterial populations and nitrogen removal in intermittently aerated reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 8565–8572.
- Moter, A., Göbel, U.B. (2000). Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microbiol Methods*, 41: 85–112.
- Mußmann M, Ribot M, von Schiller D, Merbt SN, Augspurger C, Karwautz C, Winkel M, Battin TJ, Marti E, Daims H. (2013). Colonization of freshwater biofilms by nitrifying bacteria from activated sludge. *FEMS Microbiol Ecol* 85:104–115.
- Mußmann, M., Brito, I., Pitcher, A., Damsté, J. S. S., Hatzenpichler, R., Richter, A., & Wagner, M. (2011). Thaumarchaeotes abundant in refinery nitrifying sludges express amoA but are not obligate autotrophic ammonia oxidizers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 16771-16776.
- Mulder, A. Anoxic ammonium oxidation. U.S. Patent documents 427849 (5078884). United States patent. 1992.
- Müller, A., Wetzel, M., Loewenthal, R. y Ekama, G. (2003). Heterotrophy anoxic yield in anoxic aerobic activated sludge system treating municipal wastewater. *Water Research*. 37, 2435-2441.
- Munz, G., Gori, R., Cammilli, L., & Lubello, C. (2008). Characterization of tannery wastewater and biomass in a membrane bioreactor using respirometric analysis. *Bioresource technology*, 99, 8612-8618.

## N

- Navas-Molina, J.A., Peralta-Sánchez, J.M., González, A., McMurdie, P.J., Vázquez-Baeza, Y., Xu, Z., Ursell, L.K., Lauber, C., Zhou, H., Song, S.J., Huntley, J., Ackermann, G.L., Berg-Lyons, D., Holmes, S., Caporaso, J.G., Knight, R. 2013. Advancing our understanding of the human microbiome using QIIME. *Methods Enzymol*, 531, 371-444.
- Nielsen PH, Thomsen TR, Nielsen JL (2004) Bacterial composition of activated sludge—importance for floc and sludge properties. *Water Sci Technol* 49:51–58
- Niu, W., Guo, J., Lian, J., Ngo, H. H., Li, H., Song, Y., ... & Yin, P. (2018). Effect of fluctuating hydraulic retention time (HRT) on denitrification in the UASB reactors. *Biochemical Engineering Journal*, 132, 29-37.

Nogueira R, Melo LF. (2006). Competition between *Nitrospira* spp. and *Nitrobacter* spp. in nitrite-oxidizing bioreactors. *Biotechnol Bioeng* 95: 169–177

Nowka, B., Daims, H., & Spieck, E. (2015). Comparison of oxidation kinetics of nitrite-oxidizing bacteria: nitrite availability as a key factor in niche differentiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 745-753.

## O

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.

Otawa K, Asano R, Ohba Y, Sasaki T, Kawamura E, Koyama F, Nakamura S, Nakai Y (2006) Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria community in intermittent aeration sequencing batch reactors used for animal wastewater treatment. *Environmental Microbiology*, 8, 1985–1996.

## Q

Qiang, Z., Wang, L., Dong, H., & Qu, J. (2015). Operation performance of an A/A/O process coupled with excess sludge ozonation and phosphorus recovery: a pilot-scale study. *Chemical Engineering Journal*, 268, 162-169.

Quail, M. A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T. D., Harris, S. R., Connor, T. R., ... & Gu, Y. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC genomics*, 13, 341.

Quan, Z. X., Rhee, S. K., Zuo, J. E., Yang, Y., Bae, J. W., Park, J. R., ... & Park, Y. H. (2008). Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor. *Environmental microbiology*, 10, 3130-3139.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., ... & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41(D1), D590-D596.

## P

Pan, K.L., Gao, J.F., Li, H.Y., Fan, X.Y., Li, D.C., Jiang, H., (2018). Ammonia-oxidizing bacteria dominate ammonia oxidation in a full-scale wastewater treatment plant revealed by DNA-based stable isotope probing. *Bioresource Technology*, 256, 152–159.

Park, H.-D., Lee, S.-Y., and Hwang, S. (2009) Redundancy analysis demonstration of the relevance of temperature to ammonia-oxidizing bacterial community compositions in a full-scale nitrifying bioreactor treating saline wastewater. *Journal of Microbiolal Biotechnology*, 19, 346–350.

Park JJ, Byun IG, Yu JC, Park SR, Ju DJ, et al. (2008) Analysis of nitrifying bacterial communities in aerobic biofilm reactors with different DO conditions using molecular techniques. *Water Science & Technology*, 57, 1889–1899.

Park HD, Noguera DR (2004) Evaluating the effect of dissolved oxygen on ammonia-oxidizing bacterial communities in activated sludge. *Water Res* 38: 3275–3286.

Patterson, J.W.; Brezonik, P.L.; Putnam, H.D. (1970) Measurement and significance of adenosine triphosphate in activated sludge. *Environmental Science & Technology*, 4, 569-575.

Phan, H. V., Hai, F. I., Zhang, R., Kang, J., Price, W. E., & Nghiem, L. D. (2016). Bacterial community dynamics in an anoxic-aerobic membrane bioreactor–impact on nutrient and trace organic contaminant removal. *International biodeterioration & biodegradation*, 109, 61-72.

- Pinto, A.J. et al. (2015) Metagenomic evidence for the presence of comammox Nitrospira-like bacteria in a drinking water system. *mSphere* 1, e00054-00015
- Pjevac, P., Schauberger, C., Poghosyan, L., Herbold, C. W., Van Kessel, M. A., Daebeler, A., ... & Daims, H. (2017). AmoA-targeted polymerase chain reaction primers for the specific detection and quantification of comammox Nitrospira in the environment. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1508.
- Pommerening-Röser, A., Rath, G., & Koops, H. P. (1996). Phylogenetic diversity within the genus Nitrosomonas. *Systematic and Applied Microbiology*, 19(3), 344-351.
- Poulsen, L. K., Licht, T. R., Rang, C., Krogfelt, K. A., & Molin, S. (1995). Physiological state of Escherichia coli BJ4 growing in the large intestines of streptomycin-treated mice. *Journal of Bacteriology*, 177, 5840-5845.
- Prosser, J.I., 1989. Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microbial Physiol.* 30, 125–181.
- Purkhold, U., Wagner, M., Timmermann, G., Pommerening-Röser, A., & Koops, H. P. (2003). 16S rRNA and amoA-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(6), 1485-1494.
- Purkhold, U., Pommerening-Röser, A., Juretschko, S., Schmid, M. C., Koops, H. P., & Wagner, M. (2000). Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5368-5382.

## R

- Ramdhani N, Kumari S, Bux F (2013) Distribution of nitrosomonas-related ammonia-oxidizing bacteria and nitrobacter-related nitrite-oxidizing bacteria in two full-scale biological nutrient removal plants. *Water Environ Res* 85:374–381.
- Ramette., A. (2007) Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 62: 142-160.
- Rao, J.N.K. (1968) On expectations, variances, and covariances of ANOVA mean squares by 'synthesis'. *Biometrics* 24: 963-978.
- Rodriguez, R. 2011. Use of fluorescence in situ hybridization technique to visualize microorganisms. *Salud UIS*, 43: 307-316.
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584.
- Roy, D., McEvoy, J., Blonigen, M., Amundson, M., Khan, E., (2017). Seasonal variation and ex-situ nitrification activity of ammonia oxidizing archaea in biofilm based waste-water treatment processes. *Bioresour. Technol.* 244, 850–859.
- Russ, L., Speth, D. R., Jetten, M. S. M., Op den Camp, H. J. M., and Kartal, B. (2014). Interactions between anaerobic ammonium and sulfur-oxidizing bacteria in a laboratory scale model system. *Environmental Microbiology*, 16, 3487–3498. doi: 10.1111/1462-2920.12487

## S

- Saayman, G. B., Schutte, C. F., and van Leeuwen, J., (1996). The effect of chemical bulking control on biological nutrient removal in a full scale activated sludge plant. *Water Sci. Technol.*, 34, 275–282.
- Sakai, Y., Fukase, T., Yasui, H., & Shibata, M. (1997). An activated sludge process without excess sludge production. *Water Science and Technology*, 36(11), 163-170.



- Sánchez Melsió, A. (2015). From inocula to biological reactors: molecular characterization of N-cycle bacterial assemblages in a PANAMMOX process.
- Sarma, K., Levasseur, P., Aristarkhov, A., Lee, J.T. 2010. Locked nucleic acids (LNAs) reveal sequence requirements and kinetics of Xist RNA localization to the X chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 22196-22201.
- Saunders, A. M., Albertsen, M., Vollertsen, J., & Nielsen, P. H. (2016). The activated sludge ecosystem contains a core community of abundant organisms. *The ISME journal*, 10, 11.
- Schleper, C., Jurgens, G., & Jonscheit, M. (2005). Genomic studies of uncultivated archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 3(6), 479.
- Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2004). Status of the microbial census. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68(4), 686-691.
- Schmidt, I., Sliemers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J. G., ... & Strous, M. (2003). New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS microbiology reviews*, 27, 481-492.
- Schramm, A., Beer, D., Heuvel, J.C., Ottengraf, S., 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 microelectrode. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 3690–3696.
- Semblante, G. U., Hai, F. I., Dionysiou, D. D., Fukushi, K., Price, W. E., & Nghiem, L. D. (2017). Holistic sludge management through ozonation: a critical review. *Journal of environmental management*, 185, 79-95.
- Sharpton, T. J. (2014). An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Frontiers in plant science*, 5, 209.
- Sharpton, T.J., Riesenfeld, S.J., Kembel, S.W., Ladau, J., O'Dwyer, J.P., Green, J.L., Eisen, J.A., Pollard, K.S. (2011). PhyloTUTU: a high-throughput procedure quantifies microbial community diversity and resolves novel taxa from metagenomic data. *PLoS Comput Biol*, 7: e1001061.
- Siegrist, H., Reithaar, S., Koch, G., & Lais, P. (1998). Nitrogen loss in a nitrifying rotating contactor treating ammonium-rich wastewater without organic carbon. *Water Science and Technology*, 38(8-9), 241-248.
- Siripong, S., & Rittmann, B. E. (2007). Diversity study of nitrifying bacteria in full-scale municipal wastewater treatment plants. *Water research*, 41, 1110-1120.
- Sliemers, A.O., Third, K.A., Abma, W., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M., (2002). CANON and Anammox in a gas-lift reactor. *FEMS Microbiology Letters* 218, 339-344.
- Smith AJ, Hoare DS. (1968). Acetate assimilation by *Nitrobacter agilis* in relation to its "obligate autotrophy." *J Bacteriol* 95, 844 – 855.
- Sorokin DY, Lücker S, Vejmekova D, Kostrikina NA, Kleerebezem R, Rijpstra WI, Damste JS, Le Paslier D, Muyzer G, Wagner M, van Loosdrecht MC, Daims H. (2012). Nitrification expanded: discovery, physiology and genomics of a nitrite-oxidizing bacterium from the phylum Chloroflexi. *ISME Journal*, 6, 2245–2256.
- Spang, A., Hatzepichler, R., Brochier-Armanet, C., Rattei, T., Tischler, P., Spieck, E., ... & Schleper, C. (2010). Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota. *Trends in microbiology*, 18, 331-340.
- Spanjers, H., Vanrolleghem, P., Olsson, G. & Dold, P., (1996). *Respirometry in Control of the Activated Sludge Process*. *Wat. Sci. Tech.*, 34(3-4), pp. 117-126.

- Spieck, E., Keuter, S., Wenzel, T., Bock, E., & Ludwig, W. (2014). Characterization of a new marine nitrite oxidizing bacterium, *Nitrospina watsonii* sp. nov., a member of the newly proposed phylum “Nitrospinae”. *Systematic and applied microbiology*, 37, 170-176.
- Spieck, E., Hartwig, C., McCormack, I., Maixner, F., Wagner, M., Lipski, A., & Daims, H., (2006). Selective enrichment and molecular characterization of a previously uncultured *Nitrospira*-like bacterium from activated sludge. *Environmental Microbiology*, 8, 405-415.
- Spieck, E., Ehrich, S., Aamand, J., & Bock, E. (1998). Isolation and immunocytochemical location of the nitrite-oxidizing system in *Nitrospira moscoviensis*. *Archives of microbiology*, 169(3), 225-230.
- Spieck E, Müller S, Engel A, Mandelkow E, Patel H, Bock E (1996) Two-dimensional structure of membrane-bound nitrite oxidoreductase from *Nitrobacter hamburgensis*. *J Struct Biol* 117:117–123.
- Srithep, P., Pornkulwat, P., & Limpiyakorn, T. (2018). Contribution of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria to ammonia oxidation in two nitrifying reactors. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(9), 8676-8687.
- Stahl, D.A., Amann, R., (1991). Development and application of nucleic acid probes. Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley Inc., New York, pp. 205–248.
- Steinmüller W, Bock E. (1976). Growth of *Nitrobacter* in the presence of organic matter. I. Mixotrophic growth. *Arch Microbiol* 108:299 –304. 67. Freitag A, Rudert M, Bock E. 1987. Growth of *Nitrobacter* by dissimilatoric nitrate reduction. *FEMS Microbiol Lett* 48:105–109.
- Sui, P., Nishimura, F., Tsuno, H., (2014). Nitrogen behavior during sludge ozonation: a long-term observation by pilot experiments. *Water Sci. Technol.* 70, 289-296.
- Swanner ED, Templeton AS. (2011). Potential for nitrogen fixation and nitrification in the granite-hosted subsurface at Henderson Mine, CO. *Front Microbiol* 2:254.

## T

- Tan, N. C. G., Kampschreur, M. J., Wanders, W., van der Pol, W. L. J., van de Vossenberg, J., Kleerebezem, R., et al. (2008). Physiological and phylogenetic study of an ammonium-oxidizing culture at high nitrite concentrations. *Syst. Appl. Microbiol.* 31, 114–125.
- Tang, Y., Yu, G., Zhang, X., Wang, Q., Tian, D., Tian, J., ... & Ge, J. (2019). Environmental variables better explain changes in potential nitrification and denitrification activities than microbial properties in fertilized forest soils. *Science of the total environment*, 647, 653-662.
- Tang, Y., Zhang, X., Li, D., Wang, H., Chen, F., Fu, X., Fang, X., Sun, X., Yu, G., (2016). Impacts of nitrogen and phosphorus additions on the abundance and community structure of ammonia oxidizers and denitrifying bacteria in Chinese fir plantations. *Soil Biol. Biochem.* 103, 284–293.
- Tchobanoglous, G., Burton, F.L., y Stensel, H.D. (2003) *Metcalf & Eddy, Inc.'s Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, and Reuse*, 4th Edition. New York: McGraw-Hill, Inc., 1819 pp.
- Temperton, B., & Giovannoni, S. J. (2012). Metagenomics: microbial diversity through a scratched lens. *Current opinion in microbiology*, 15, 605-612.
- Teske, A., Alm, E., Regan, J. M., Toze, S., Rittmann, B. E., & Stahl, D. A. (1994). Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *Journal of bacteriology*, 176, 6623-6630.
- Thandar, S. M., Ushiki, N., Fujitani, H., Sekiguchi, Y., & Tsuneda, S. (2016). Ecophysiology and comparative genomics of *Nitrosomonas mobilis* Ms1 isolated from autotrophic nitrifying granules of wastewater treatment bioreactor. *Frontiers in microbiology*, 7, 1869.

Tringe, S.G., Rubin, E.M. 2005. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. *Nat Rev Genet.* 2005 Nov; 6: 805-814.

Tsuneda, S., Nagano, T., Hoshino, T., Ejiri, Y., Noda, N., and Hirata, A. (2003). Characterization of nitrifying granules produced in an aerobic upflow fluidized bed reactor. *Water Research.* 37, 4965–4973.

## U

Umar, M., Roddick, F., Fan, L., & Aziz, H. A. (2013). Application of ozone for the removal of bisphenol A from water and wastewater—a review. *Chemosphere*, 90, 2197-2207.

## V

Vadivelu, V. M., Yuan, Z., Fux, C., & Keller, J. (2006). Stoichiometric and kinetic characterisation of *Nitrobacter* in mixed culture by decoupling the growth and energy generation processes. *Biotechnology and bioengineering*, 94, 1176-1188.

Van Dijk, E.L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., Thermes, C. 2014. Ten years of next- generation sequencing technology. *Trends Genet*, 30, 418-426.

Van Hulle, S. W., Vandeweyer, H. J., Meesschaert, B. D., Vanrolleghem, P. A., Dejans, P., & Dumoulin, A. (2010). Engineering aspects and practical application of autotrophic nitrogen removal from nitrogen rich streams. *Chemical Engineering Journal*, 162, 1-20.

Van Kessel, M. A., Speth, D. R., Albertsen, M., Nielsen, P. H., den Camp, H. J. O., Kartal, B., ... & Lücker, S. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, 528(7583), 555.

Van Leeuwen, J., & Pretorius, W. A., 1988. Sludge bulking control with ozone. *Water and Environmental Journal*, 2, 223-227.

Van Loosdrecht, M. C. M., & Jetten, M. S. M. (1998). Microbiological conversions in nitrogen removal. *Water Science and Technology*, 38, 1-7.

Vang, Ó. K., Corfitzen, C. B., Smith, C., & Albrechtsen, H. J. (2014). Evaluation of ATP measurements to detect microbial ingress by wastewater and surface water in drinking water. *Water research*, 64, 309-320.

Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., et al., 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304, 66–74.

Vergine, P., Menin, G., Canziani, R., Ficara, E., Fabiyi, M., Novak, R., ... & Bergna, G. (2007). Partial ozonation of activated sludge to reduce excess sludge production: evaluation of effects on biomass activity in a full scale demonstration test. In *International Water Association Specialist Conference*, Moncton, Canada.

Vital, M., Dignum, M., Magic-Knezev, A., Ross, P., Rietveld, L., & Hammes, F. (2012). Flow cytometry and adenosine tri-phosphate analysis: alternative possibilities to evaluate major bacteriological changes in drinking water treatment and distribution systems. *Water research*, 46, 4665-4676.

Vuono, D. C., Benecke, J., Henkel, J., Navidi, W. C., Cath, T. Y., Munakata-Marr, J., ... & Drewes, J. E. (2015). Disturbance and temporal partitioning of the activated sludge metacommunity. *The ISME journal*, 9, 425.

## W

Wagner, M., Rath, G., Koops, H. P., Flood, J., & Amann, R. (1996). In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Water Science and Technology*, 34(1-2), 237-244.

- Wagner, M., Rath, G., Amann, R., Koops, H. P., & Schleifer, K. H. (1995). In situ identification of ammonia-oxidizing bacteria. *Systematic and applied microbiology*, 18, 251-264.
- Wagner, M., Amman, R., Lemmer, H., and 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.
- Wallner M., Erhart, E. and Amann R. (1995). Flowcytometric analysis of activated sludge with rRNA-targeted probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 1859-1866.
- Wan CY, De Wever H, Diels L et al (2011) Biodiversity and population dynamics of microorganisms in a full-scale membrane bioreactor for municipal wastewater treatment. *Water Research*, 45,1129–1138
- Wang, M., Huang, G., Zhao, Z., Dang, C., Liu, W., & Zheng, M. (2018). Newly designed primer pair revealed dominant and diverse comammox amoA gene in full-scale wastewater treatment plants. *Bioresource technology*, 270, 580-587.
- Wang, J., Gong, B., Huang, W., Wang, Y., & Zhou, J. (2017). Bacterial community structure in simultaneous nitrification, denitrification and organic matter removal process treating saline mustard tuber wastewater as revealed by 16S rRNA sequencing. *Bioresource technology*, 228, 31-38.
- Wang P, Zhang H, Zuo J, Zhan D, Zou X, Zhu Z et al., (2016). A Hardy Plant facilitates nitrogen removal via microbial communities in subsurface flow constructed wetlands in winter. *Sci Rep* 6:33600–33611
- Wang, Z., Zhang, X. X., Lu, X., Liu, B., Li, Y., Long, C., & Li, A. (2014). Abundance and diversity of bacterial nitrifiers and denitrifiers and their functional genes in tannery wastewater treatment plants revealed by high-throughput sequencing. *PLoS One*, 9, e113603.
- Wang, X., Hu, M., Xia, Y., Wen, X., & Ding, K. (2012). Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in 14 wastewater treatment systems in China. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), 7042-7047.
- Wang, L., Zheng, Z., Luo, X., & Zhang, J. (2011). Performance and mechanisms of a microbial-earthworm ecofilter for removing organic matter and nitrogen from synthetic domestic wastewater. *Journal of hazardous materials*, 195, 245-253.
- Wang, X., Wen, X., Criddle, C., Wells, G., Zhang, J., Zhao, Y., 2010. Community analysis of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of eight wastewater treatment systems. *Journal of Environmental Science*, 22, 627–634.
- Watson, S. W., & Waterbury, J. B. (1971). Characteristics of two marine nitrite oxidizing bacteria, *Nitrospina gracilis* nov. gen. nov. sp. and *Nitrococcus mobilis* nov. gen. nov. sp. *Archiv für Mikrobiologie*, 77, 203-230.
- Wang, S., Ma, J., Liu, B., Jiang, Y., & Zhang, H. (2008). Degradation characteristics of secondary effluent of domestic wastewater by combined process of ozonation and biofiltration. *Journal of hazardous materials*, 150, 109-114.
- Watson SW, Bock E, Valois FW, Waterbury JB, Schlosser U. 1986. *Nitrospira marina* gen. nov. sp. nov.: a chemolithotrophic nitrite-oxidizing bacterium. *Arch Microbiol* 144:1–7.
- Weddle and Jenkins, 1971; Weddle C.L. and Jenkins D . 1971. The viability and activity of activated sludge. *Water Research*, 5, 621-640
- Weidler, G. W., Dornmayr-Pfaffenhuemer, M., Gerbl, F. W., Heinen, W., & Stan-Lotter, H. (2007). Communities of Archaea and Bacteria in a subsurface radioactive thermal spring in the Austrian Central Alps, and evidence of ammonia-oxidizing Crenarchaeota. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 259-270.
- Wells, G. F., Park, H.-D., Yeung, C.-H., Eggleston, B., Francis, C. A., and Criddle, C. S. (2009). Ammonia-oxidizing communities in a highly aerated full-scale activated sludge bioreactor: betaproteobacterial dynamics and low relative abundance of Crenarchaea. *Environmental Microbiology*, 11, 2310–2328.

- Weemaes, M., Grootaerd, H., Simoens, F., & Verstraete, W. (2000). Anaerobic digestion of ozonized biosolids. *Water Research*, 34, 2330-2336.
- Wertz S, Leigh AK, Grayston SJ. (2012). Effects of long-term fertilization of forest soils on potential nitrification and on the abundance and community structure of ammonia oxidizers and nitrite oxidizers. *FEMS Microbiol Ecol* 79, 142–154.
- Whalen, P. A., Tracey, D. R., & Duguay, J. (2018). Adenosine Triphosphate (ATP) measurement technology. *Microbiological*. [https://www.luminultra.com/wp-content/uploads/08\\_Skovhus\\_Ch08\\_R3.pdf](https://www.luminultra.com/wp-content/uploads/08_Skovhus_Ch08_R3.pdf) (consultado 10/01/2018).
- Whalen, P. A., Whalen, P. J., & Tracey, D. R. (2006). Cellular ATP—a superior measure of active biomass for biological wastewater treatment processes. *Proceedings of the Water Environment Federation*, 3025-3037.
- White, C. P., DeBry, R. W., & Lytle, D. A. (2012). Microbial survey of a full-scale, biologically active filter for treatment of drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 6390-6394.
- Winkler, M. K., Boets, P., Hahne, B., Goethals, P., & Volcke, E. I. (2017). Effect of the dilution rate on microbial competition: r-strategist can win over k-strategist at low substrate concentration. *PloS one*, 12, e0172785.
- Winogradsky S. 1890. Recherches sur les organismes de la nitrification. *Ann Inst Pasteur* 4:213–231.
- Wylie, K.M., Truty, R.M., Sharpton, T.J., Mihindukulasuriya, K.A., Zhou, Y., Gao, H., Sodergren, E., Weinstock, G.M., Pollard, K.S. 2012. Novel bacterial taxa in the human microbiome. *PLoS One* 7: e35294.

## X

- Xia, S., Li, J., & Wang, R. (2008). Nitrogen removal performance and microbial community structure dynamics response to carbon nitrogen ratio in a compact suspended carrier biofilm reactor. *Ecological Engineering*, 32, 256-262.
- Xie, S., Zhang, X., Wang, Z., 2003. Temperature effect on aerobic denitrification and nitrification. *Journal of Environmental Sciences*, 15, 669–673.
- Xue, J., Schmitz, B. W., Caton, K., Zhang, B., Zabaleta, J., Garai, J., ... & Sherchan, S. P. (2019). Assessing the spatial and temporal variability of bacterial communities in two Bardenpho wastewater treatment systems via Illumina MiSeq sequencing. *Science of The Total Environment*, 657, 1543-1552.

## Y

- Yan, S.-T., Zheng, H., Li, A., Zhang, X., Xing, X.-H., Chu, L.-B., Ding, G., Sun, X.-L., Jurcik, B., (2009a). Systematic analysis of biochemical performance and the microbial community of an activated sludge process using ozone-treated sludge for sludge reduction. *Bioresource Technology*, 100, 5002-5009.
- Yan, S. T., Chu, L. B., Xing, X. H., Yu, A. F., Sun, X. L., & Jurcik, B., (2009b). Analysis of the mechanism of sludge ozonation by a combination of biological and chemical approaches. *Water research*, 43, 195-203.
- Yang, B., Wang, Y., Qian, P.Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, 17, 135.
- Yang, S. F., Tay, J. H., & Liu, Y. (2004). Respirometric activities of heterotrophic and nitrifying populations in aerobic granules developed at different substrate N/COD ratios. *Current microbiology*, 49, 42-46.
- Yao, Q., & Peng, D. C. (2017). Nitrite oxidizing bacteria (NOB) dominating in nitrifying community in full-scale biological nutrient removal wastewater treatment plants. *AMB Express*, 7, 25.

- Yapsakli, K., Aliyazicioglu, C., & Mertoglu, B. (2011). Identification and quantitative evaluation of nitrogen-converting organisms in a full-scale leachate treatment plant. *Journal of environmental management*, 92, 714-723.
- Yapsakli, K., Mertoglu, B., & Çeçen, F. (2010). Identification of nitrifiers and nitrification performance in drinking water biological activated carbon (BAC) filtration. *Process Biochemistry*, 45, 1543-1549.
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glockner, F.O., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Whitman, W.B., Euzéby, J., Amann, R., Rossello-Mora, R., (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12, 635–645.
- Yasui, H., & Shibata, M. (1994). An innovative approach to reduce excess sludge production in the activated sludge process. *Water science and technology*, 30, 11.
- Ye, L., Zhang, T., Wang, T., & Fang, Z. (2012). Microbial structures, functions, and metabolic pathways in wastewater treatment bioreactors revealed using high-throughput sequencing. *Environmental Science & Technology*, 46, 13244-13252.
- You SJ, Hsu CL, Chuang SH, Ouyang CF (2003) Nitrification efficiency and nitrifying bacteria abundance in combined AS-RBC and A<sup>2</sup>O systems. *Water Research*, 37, 2281–2290.

## Z

- Zhang, Y., Kong, M., Hua, M., Wang, L., Zhou, M., Peng, F., ... & Xu, B. (2019). Association of robust nitrogen removal with spatiotemporal nitrifying bacterial community dynamics in a new bioreactor for treatment of simulated livestock wastewater with high ammonia content. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 94, 618-627.
- Zhang, Y., Kong, M., Hua, M., Wang, L., Zhou, M., Peng, F., ... & Xu, B. (2019). Association of robust nitrogen removal with spatiotemporal nitrifying bacterial community dynamics in a new bioreactor for treatment of simulated livestock wastewater with high ammonia content. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 94, 618-627.
- Zhang T, Shao M-F, Ye L. (2012). 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *ISME Journal*, 6,1137–1147.
- Zhang, J., Chiodini, R., Badr, A., & Zhang, G. (2011a). The impact of next-generation sequencing on genomics. *Journal of genetics and genomics*, 38, 95-109.
- Zhang, T., Ye, L., Tong, A.H.Y., Shao, M.-F., and Lok, S. (2011b) Ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria in six full-scale wastewater treatment bioreactors. *Applied and Environmental Microbiology*, 91, 1215–1225
- Zheng, M., Wang, M., Zhao, Z., Zhou, N., He, S., Liu, S., ... & Wang, X. (2019). Transcriptional activity and diversity of comammox bacteria as a previously overlooked ammonia oxidizing prokaryote in full-scale wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, 656, 717-722.
- Zhou, X. J., Guo, W. Q., Yang, S. S., Zheng, H. S., & Ren, N. Q. (2013). Ultrasonic-assisted ozone oxidation process of triphenylmethane dye degradation: evidence for the promotion effects of ultrasonic on malachite green decolorization and degradation mechanism. *Bioresource technology*, 128, 827-830.
- Zhou, Q., Gao, T., (2000). *Microbiology of Environmental Engineering*, second ed. Higher Education Press, Beijing.
- Ziglio, G., Andreottola, G., Barbesti, S., Boschetti, G., Bruni, L., Foladori, P., & Villa, R. (2002). Assessment of activated sludge viability with flow cytometry. *Water Research*, 36, 460-468.
- Zornoza, A., (2017). Estudio de la dinámica poblacional de protistas, metazoos y bacterias filamentosas y su interpretación ecológica en fangos activos Tesis. Valencia: Universitat Politècnica de València.

# Anexos

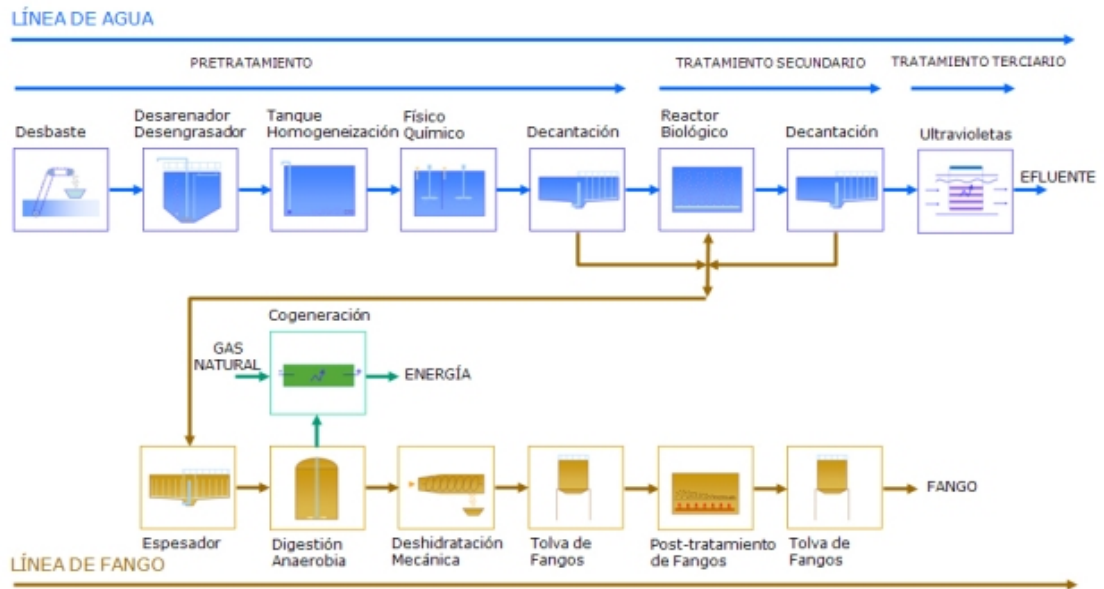
---



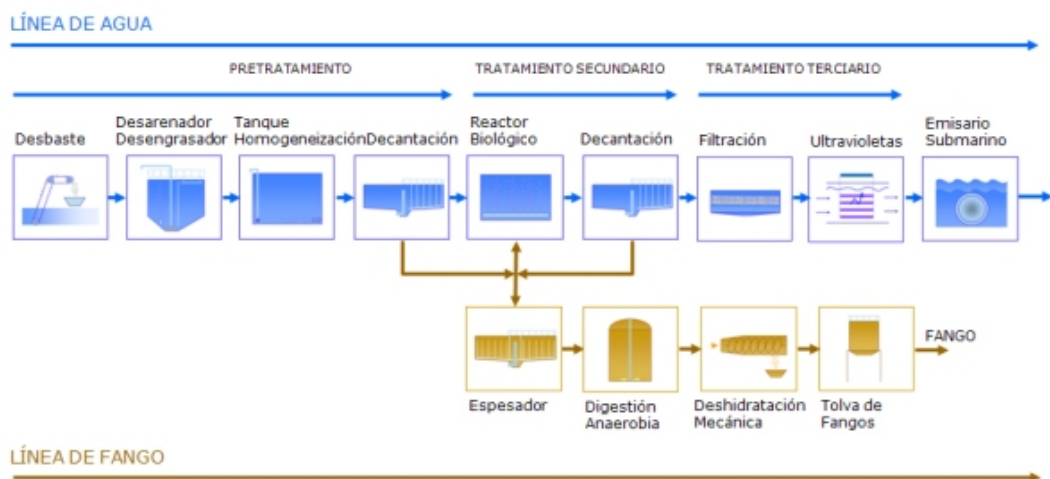


ANEXO 1. ESQUEMA DE LAS EDAR ANALIZADAS EN ESTE ESTUDIO

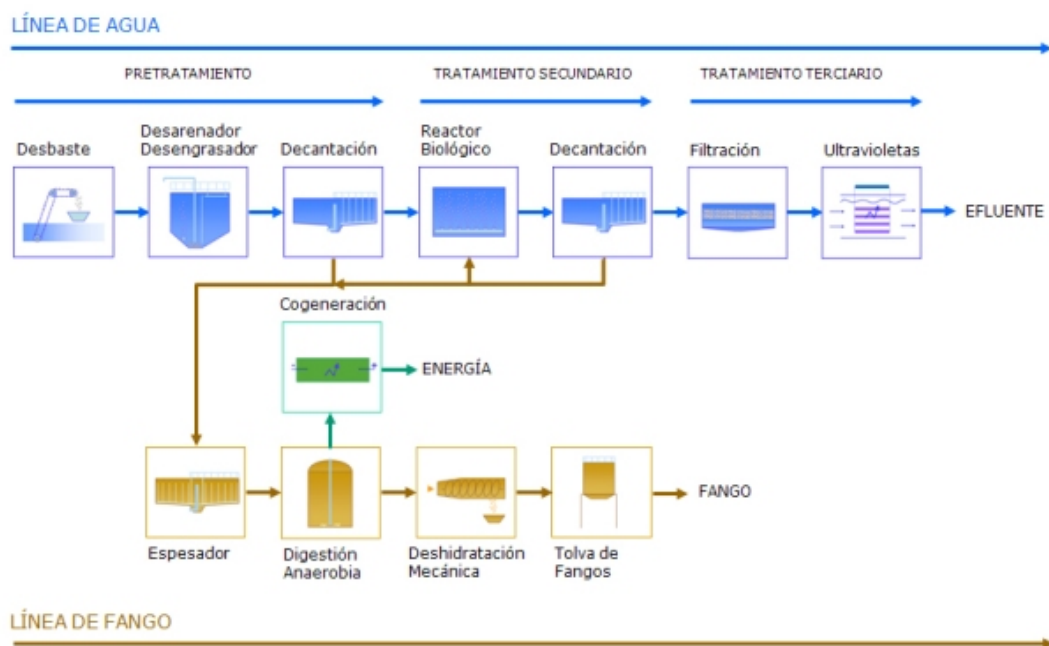
ESQUEMA EDAR QUART-BENAGER



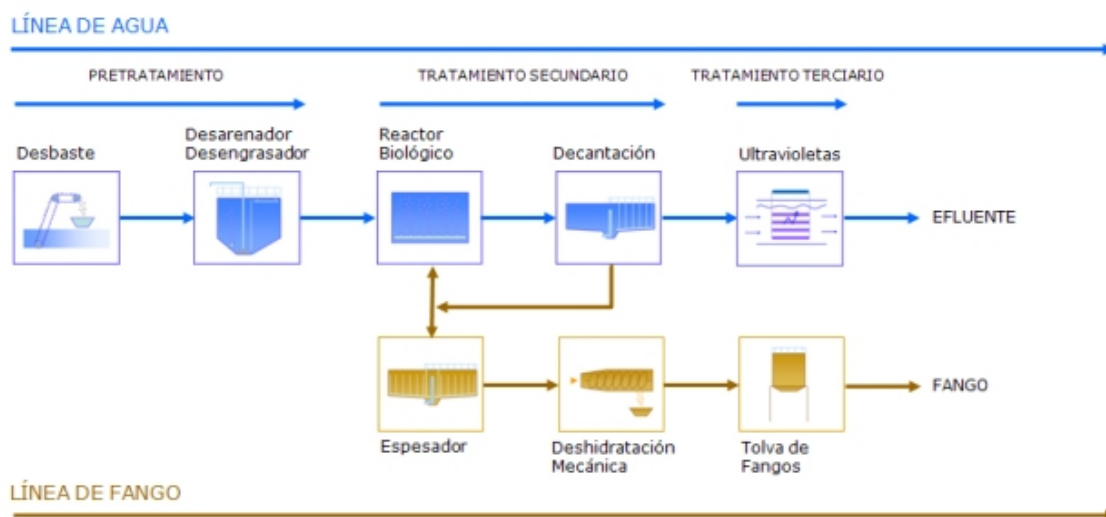
ESQUEMA EDAR CASTELLON



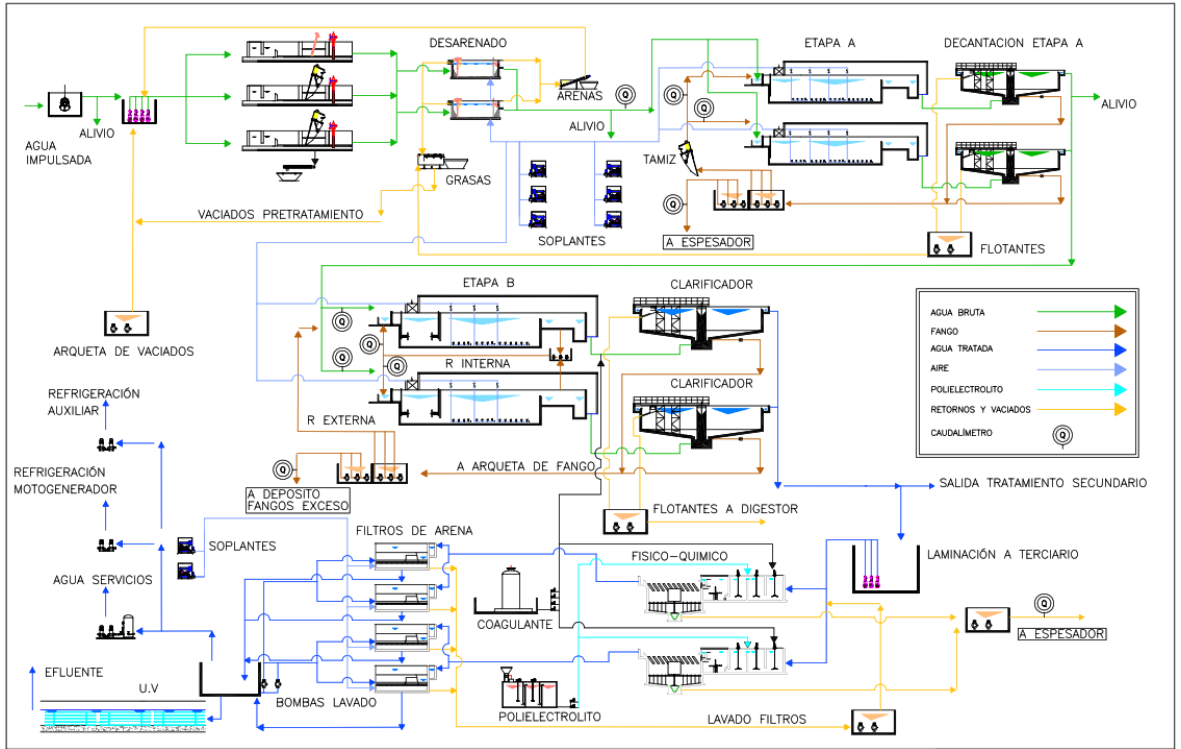
ESQUEMA EDAR CUENCA DEL CARRAIXET



ESQUEMA EDAR DENIA-ONDARA-PEDREGUER



ESQUEMA EDAR MOLINA DEL SEGURA



## ANEXO 2. PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES. TÉCNICA FISH

*Paraformaldehido*

Agua destilada	65 ml
PFA	4g
NaOH 2M	1gota
PBS 3X	33 ml
HCl	

Calentar 65 mL de agua destilada hasta 60°C, añadir 4g PFA. A continuación añadir 1 gota de solución de NaOH 2M y agitar rápidamente hasta que la solución se haya clarificado. Quitar de la fuente de calor y añadir 33 ml de PBS 3X. Ajustar el pH a 7.2 con HCl. Eliminar cualquier resto de cristales por filtración a través de 0,2  $\mu\text{m}$ . Enfriar rápidamente a 4°C y conservar a esa temperatura.

Esterilizar por filtración 0,45 o 0,2  $\mu\text{m}$  y conservar a 4°C, se utiliza frío.

*Tampón fosfato salino (XPBS)*

Preparar 3X PBS para reactivo de paraformaldehido

NaCl	22,8 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,88 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los fosfatos y el NaCl a continuación. Ajustar pH a 7,4. Esterilizar por filtración 0,45 o 0,2  $\mu\text{m}$  y conservar a 4°C, se utiliza frío.

*NaCl 5M*

Cloruro de sodio (NaCl)	292,2 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver el NaCl en 800 ml de agua destilada y ajustar el volumen hasta 1 litro. Esterilizar en autoclave 121°C durante 15 minutos y por filtración.

*Tris-HCl 1M pH 8.0*

Tris Base	121,1g
HCl concentrado	42 ml
Agua destilada	Hasta 1000 ml

Pesar el Tris Base y añadir a 800 ml de agua destilada. Añadir 42 ml de HCl concentrado y completar hasta 1000 ml con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos y filtrar posteriormente.

*SDS 10%*

SDS	10 g
Agua destilada Hasta	100 ml

Esterilizar por filtración.

*EDTA 0,5 M*

EDTA ·2H <sub>2</sub> O	186,1 g
Agua destilada Hasta	1000 ml

Pesar el EDTA y añadir a 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8,0 con NaOH. Completar hasta 1000 ml con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos y filtrar posteriormente.

#### *Preparación de los portaobjetos para FISH*

Para implementar la técnica FISH se utilizaron portaobjetos cubiertos de teflón (Marienfeld, ref. 9782100). Previamente a su utilización los portaobjetos son lavados y gelatinizados con el objetivo de asegurar la retención de las células durante el mayor tiempo posible tras los lavados previos y posteriores a la hibridación. A continuación se describe el procedimiento empleado para ello.

- Lavar los portaobjetos con agua destilada y detergente neutro.
- Enjuagar con agua destilada.
- Dejar secar los portaobjetos 24 horas en un ambiente protegido de polvo.
- Preparar una solución con gelatina bacteriológica (Panreac, ref. 403902) al 0,1% y sulfato potásico cromato (Sigma ref. C-5926) al 0,01% en agua destilada a 60°C. Mantener a 60°C hasta la completa disolución de los reactivos.
- Atemperar la solución a 50°C y cubrir los portaobjetos por inmersión en la solución.
- Dejar secar los portaobjetos al aire protegidos del polvo ambiental.

#### *Deshidratación de las muestras*

- Etanol 50%: 100 ml Etanol absoluto + 100 ml agua destilada. Guardar a temperatura ambiente.
- Etanol 80%: 160 ml Etanol absoluto + 40 ml agua destilada. Guardar a temperatura ambiente.
- Etanol 100 %: Reactivo etanol absoluto grado PRS. Guardar a temperatura ambiente y a 4°C para fijación.

### *Preparación de la solución de hibridación*

La solución tampón de hibridación se prepara en un microtubo de 2 mL, adicionando Añadir 360  $\mu\text{L}$  de NaCl 5M, 40  $\mu\text{L}$  TrisHCl 1M, el porcentaje de formamida adecuado en función de la sonda a emplear (Tabla A.1.), 2  $\mu\text{L}$  de sodio dodecil sulfato (SDS) al 10% y el volumen de agua requerido hasta completar 2mL. A continuación se mezcla cuidadosamente.

Una vez preparado el tampón de hibridación se prepara una solución que contenga 9  $\mu\text{L}$  de solución tampón de hibridación y 1  $\mu\text{L}$  de las sondas por cada pocillo a hibridar.

Las sondas se adicionan en cantidades equimoleculares para alcanzar una concentración de 25 ng de la sonda EUBMix (EUBI, EUBII, EUBIII y EUBIV) y una concentración de 25 ng de la sonda de genero o especie específica para la identificación de bacterias nitrificantes.

Tabla A. 1. Cantidad de formamida para la preparación del tampón de hibridación.

%Formamida	Cantidad formamida ( $\mu\text{L}$ )	Cantidad de agua MilliQ ( $\mu\text{L}$ )
10	200	1398
20	400	1198
35	700	898
40	800	798
45	900	698
50	1000	598

### *Preparación de la solución de lavado*

La solución de lavado fue preparada en un tubo tipo falcón de 50 mL. Se adiciona la cantidad de NaCl 5M indicada según el porcentaje de formamida empleado en la solución de hibridación (Tabla A.2.), 500  $\mu\text{L}$  EDTA 0,5M, 1000  $\mu\text{L}$  de HCl-Tris 1M, 50  $\mu\text{L}$  de SDS al 10% y agua destilada MilliQ hasta completar 50mL. Tras la adición de todos los reactivos la muestra agitar cuidadosamente.

Tabla A. 2. Cantidad de NaCl para la preparación del tampón de lavado.

%Formamida Tampón hibridación	Tampón de lavado
10	4500
20	2150
35	700
40	460
45	230
50	125



Tabla A. 3. Preparación de reactivos y soluciones. Respirometría.

*HCl 0,1 M*

Ácido clorhídrico fumante 37%, d = 1,19	4,11 ml
Agua destilada	500 ml

*NaOH 0,1 M*

Hidróxido de sodio 98%	2,04 g
Agua destilada	500 ml

*Allil Tiourea*

Allil Tiourea	100 mg
Agua destilada	100 ml

## ANEXO 3. ABUNDANCIA RELATIVA DE LAS BACTERIAS NITRIFICANTES

Tabla A. 4. Abundancia relativa de bacterias nitrificantes en el reactor CT1.

MUESTRA	Nso 1225 (%)	Nmo 218 (%)	NEU (%)	Nse 1472 (%)	NmV (%)	Ntspa 662 (%)	Ntoga 122 (%)	NIT3 (%)	Ntcl 804 (%)	Thau 1162 (%)	Cren 679 (%)
CT1-1	2	2	<1%	0	0	1	<1%	0	0	0	0
CT1-2	2	<1%	1	0	0	0	1	0	0	0	0
CT1-3	2	<1%	0	0	0	<1%	<1%	0	0	0	0
CT1-4	1	<1%	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CT1-5	1	1	0	0	0	<1%	0	0	0	0	0
CT1-6	1	<1%	0	0	0	<1%	0	0	0	0	0
CT1-7	2	0	2	0	0	0	<1%	0	0	0	0
CT1-8	3	1	0	0	0	0	<1%	0	0	0	0
CT1-9	3	1	0	0	0	<1%	<1%	0	0	0	0
CT1-10	3	<1%	0	0	0	<1%	2	0	0	0	0
CT1-11	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
CT1-12	4	4	<1%	0	0	0	<1%	0	0	0	0
CT1-13	1	1	1	0	0	0	<1%	0	0	0	0
CT1-14	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CT1-15	4	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0
CT1-16	2	0	<1%	0	0	<1%	0	0	0	0	0
CT1-17	2	1	<1%	0	0	0	1	0	0	0	0
CT1-18	3	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
CT1-19	5	<1%	1	0	0	0	1	0	0	0	0
CT1-20	5	1	0	0	0	0	<1%	0	0	0	0
CT1-21	1	<1%	<1%	0	0	0	1	0	0	0	0
CT1-22	3	<1%	0	0	0	0	1	0	0	0	0
CT1-23	5	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0

Tabla A. 5. Abundancia relativa de bacterias nitrificantes en el reactor CT2.

MUESTRA	Nso 1225 (%)	Nmo 218 (%)	NEU (%)	Nse 1472 (%)	NmV (%)	Ntspa 662 (%)	Ntoga 122 (%)	NIT3 (%)	Ntcl 804 (%)	Thau 1162 (%)	Cren 679 (%)
CT2-1	3	2	1	0	0	1	1	0	0	0	0
CT2-2	4	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
CT2-3	4	3	<1%	0	0	0	1	0	0	0	0
CT2-4	4	1	<1%	0	0	0	0	0	0	0	0
CT2-5	3	<1%	<1%	0	0	<1%	2	0	0	0	0
CT2-6	3	<1%	<1%	0	0	0	0	0	0	0	0
CT2-7	2	1	<1%	0	0	0	0	0	0	0	0
CT2-8	2	1	1	0	0	0	2	0	0	0	0
CT2-9	2	2	1	0	0	0	2	0	0	0	0
CT2-10	2	2	<1%	0	0	0	2	0	0	0	0
CT2-11	3	2	<1%	0	0	0	1	0	0	0	0
CT2-12	4	2	0	0	0	<1%	1	0	0	0	0
CT2-13	4	3	1	0	0	0	<1%	0	0	0	0
CT2-14	4	2	0	0	0	<1%	1	0	0	0	0
CT2-15	4	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0
CT2-16	3	1	0	0	0	0	<1%	0	0	0	0
CT2-17	2	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
CT2-18	2	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0
CT2-19	3	2	<1%	0	0	0	<1%	0	0	0	0
CT2-20	4	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
CT2-21	4	1	<1%	0	0	0	<1%	0	0	0	0
CT2-22	5	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0
CT2-23	3	1	1	0	0	0	<1%	0	0	0	0

Tabla A. 6. Abundancia relativa de bacterias nitrificantes en el reactor DN.

MUESTRA	Nso 1225 (%)	Nmo 218 (%)	NEU (%)	Nse 1472 (%)	NmV (%)	Ntspa 662 (%)	Ntoga 122 (%)	NIT3 (%)	Ntcl 804 (%)	Thau 1162 (%)	Cren 679 (%)
DN 1	4	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0
DN 2	2	1	1	0	0	4	0	0	0	0	0
DN 3	3	3	1	0	0	3	0	<1%	0	0	0
DN 4	3	2	1	0	0	5	0	<1%	0	0	0
DN 5	4	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
DN 6	4	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
DN 7	4	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0
DN 8	4	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0
DN 9	3	1	<1%	0	0	1	0	0	0	0	0
DN 10	5	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
DN 11	2	2	2	0	0	1	0	0	0	0	0
DN 12	4	2	2	0	0	1	0	<1%	0	0	0
DN 13	4	2	2	0	0	1	0	<1%	0	0	0
DN 14	3	1	1	0	0	1	0	<1%	0	0	0
DN 15	2	1	1	0	0	1	0	<1%	0	0	0
DN 16	3	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
DN 17	2	2	1	0	0	3	0	0	0	0	0
DN 18	2	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
DN 19	3	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
DN 20	2	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
DN 21	2	1	<1%	0	0	1	0	<1%	0	0	0
DN 22	3	0	<1%	0	0	2	0	0	0	0	0

Tabla A. 7. Abundancia relativa de bacterias nitrificantes en el reactor QB.

MUESTRA	Nso 1225 (%)	Nmo 218 (%)	NEU (%)	Nse 1472 (%)	NmV (%)	Ntspa 662 (%)	Ntoga 122 (%)	NIT3 (%)	Ntcl 804 (%)	Thau 1162 (%)	Cren 679 (%)
QB 1	4	4	0	0	0	3	0	0	0	0	0
QB 2	3	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0
QB 3	3	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0
QB 4	6	5	0	0	0	4	0	0	0	0	0
QB 5	6	5	0	0	0	2	0	0	0	0	0
QB 6	3	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0
QB 7	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QB 8	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
QB 9	2	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0
QB 10	5	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0
QB 11	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QB 12	4	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0
QB 13	6	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0
QB 14	6	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0
QB 15	6	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0
QB 16	6	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0
QB 17	6	3	0	0	0	2	0	0	0	0	0
QB 18	3	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0
QB 19	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
QB 20	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
QB 21	6	5	0	0	0	1	0	0	0	0	0
QB 22	6	4	0	0	0	4	0	0	0	0	0
QB 23	5	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0
QB 24	3	3	0	0	0	3	0	0	0	0	0

Tabla A. 8. Abundancia relativa de bacterias nitrificantes en el reactor CX.

MUESTRA	Nso 1225 (%)	Nmo 218 (%)	NEU (%)	Nse 1472 (%)	NmV (%)	Ntspa 662 (%)	Ntoga 122 (%)	NIT3 (%)	Ntcl 804 (%)	Thau 1162 (%)	Cren 679 (%)
CX 1	3	1	2	0	0	2	1	0	0	0	0
CX 2	2	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
CX 3	2	1	2	0	0	1	<1%	0	0	0	0
CX 4	2	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0
CX 5	2	2	2	0	0	2	0	0	0	0	0
CX 6	1	0	2	0	0	2	1	0	0	0	0
CX 7	3	2	1	0	0	1	2	0	0	0	0
CX 8	4	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
CX 9	2	2	2	0	0	1	1	0	0	0	0
CX 10	2	2	1	0	0	2	3	0	0	0	0
CX 11	2	1	1	0	0	2	1	0	0	0	0
CX 12	2	1	1	0	0	2	2	0	0	0	0
CX 13	2	1	1	0	0	2	1	0	0	0	0
CX 14	2	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0
CX 15	2	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0
CX 16	3	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0
CX 17	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
CX 18	5	2	1	0	0	2	0	0	0	0	0
CX 19	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
CX 20	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Tabla A. 9. Abundancia relativa de bacterias nitrificantes en el reactor ML

MUESTRA	Nso 1225 (%)	Nmo 218 (%)	NEU (%)	Nse 1472 (%)	NmV (%)	Ntspa 662 (%)	Ntoga 122 (%)	NIT3 (%)	Ntcl 804 (%)	Thau 1162 (%)	Cren 679 (%)
ML 1	1	<1%	0	0	0	<1%	0	0	0	0	0
ML 2	1	<1%	0	0	0	1	0	0	0	0	0
ML 3	1	<1%	0	0	0	1	0	0	0	0	0
ML 4	1	<1%	0	0	0	<1%	0	0	0	0	0
ML 5	1	<1%	<1%	0	0	<1%	0	<1%	0	0	0
ML 6	1	1	<1%	0	0	<1%	0	<1%	0	0	0
ML 7	2	<1%	<1%	0	0	<1%	0	<1%	0	0	0
ML 8	2	<1%	<1%	0	0	<1%	0	<1%	0	0	0
ML 9	2	1	1	0	0	<1%	0	0	0	0	0
ML 10	3	<1%	1	0	0	<1%	0	0	0	0	0
ML 11	1	<1%	1	0	0	<1%	0	0	0	0	0
ML 12	2	1	1	0	0	<1%	0	0	0	0	0
ML 13	<1%	1	1	0	0	<1%	0	0	0	0	0
ML 14	<1%	<1%	<1%	0	0	<1%	0	<1%	0	0	0
ML 15	1	<1%	<1%	0	0	<1%	0	<1%	0	0	0
ML 16	1	<1%	0	0	0	<1%	0	<1%	0	0	0
ML 17	1	<1%	<1%	0	0	<1%	0	<1%	0	0	0
ML 18	1	<1%	0	0	0	<1%	0	0	0	0	0
ML 19	1	<1%	<1%	0	0	<1%	<1%	0	0	0	0
ML 20	1	<1%	<1%	0	0	<1%	<1%	<1%	0	0	0
ML 21	1	0	<1%	0	0	<1%	<1%	0	0	0	0
ML 22	1	0	<1%	0	0	<1%	<1%	0	0	0	0
ML 23	<1%	<1%	<1%	0	0	<1%	<1%	0	0	0	0
ML 24	<1%	0	<1%	0	0	<1%	<1%	0	0	0	0
ML 25	<1%	0	<1%	0	0	<1%	<1%	0	0	0	0
ML 26	<1%	0	<1%	0	0	<1%	<1%	0	0	0	0
ML 27	1	0	<1%	0	0	1	<1%	0	0	0	0
ML 28	1	0	1	0	0	<1%	<1%	0	0	0	0
ML 29	1	<1%	1	0	0	<1%	<1%	0	0	0	0
ML 30	<1%	0	0	0	0	<1%	<1%	0	0	0	0
ML 31	<1%	0	0	0	0	<1%	<1%	0	0	0	0
ML 32	1	0	1	0	0	0	<1%	0	0	0	0
ML 33	1	0	1	0	0	<1%	<1%	0	0	0	0
ML 34	1	0	1	0	0	<1%	<1%	0	0	0	0
ML 35	1	0	<1%	0	0	<1%	<1%	0	0	0	0
ML 36	1	0	<1%	0	0	0	<1%	0	0	0	0
ML 37	1	0	<1%	0	0	0	0	0	0	0	0
ML 38	1	<1%	<1%	0	0	0	0	0	0	0	0
ML 39	1	0	<1%	0	0	0	0	0	0	0	0
ML 40	1	0	<1%	0	0	0	0	0	0	0	0
ML 41	1	<1%	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ML 42	1	<1%	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ML 43	<1%	<1%	<1%	0	0	0	<1%	0	0	0	0
ML 44	<1%	<1%	<1%	0	0	0	0	0	0	0	0
ML 45	1	<1%	<1%	0	0	0	0	0	0	0	0

MUESTRA	Nso 1225 (%)	Nmo 218 (%)	NEU (%)	Nse 1472 (%)	NmV (%)	Ntspa 662 (%)	Ntoga 122 (%)	NIT3 (%)	Ntcl 804 (%)	Thau 1162 (%)	Cren 679 (%)
ML 46	<1%	<1%	<1%	0	0	<1%	0	0	0	0	0
ML 47	1	<1%	<1%	0	0	0	0	0	0	0	0
ML 48	1	<1%	<1%	0	0	0	0	0	0	0	0
ML 49	1	<1%	<1%	0	0	0	0	0	0	0	0
ML 50	1	<1%	<1%	0	0	0	0	0	0	0	0
ML 51	1	<1%	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ML 52	1	<1%	<1%	0	0	<1%	<1%	0	0	0	0
ML 53	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ML 54	1	<1%	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ML 55	1	<1%	0	0	0	0	<1%	0	0	0	0
ML 56	1	<1%	0	0	0	0	1	0	0	0	0
ML 57	1	<1%	0	0	0	0	<1%	0	0	0	0
ML 58	1	<1%	0	0	0	0	<1%	0	0	0	0
ML 59	1	<1%	0	0	0	0	<1%	0	0	0	0
ML 60	1	1	0	0	0	0	<1%	0	0	0	0
ML 61	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ML 62	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
ML 63	1	0	<1%	0	0	0	<1%	0	0	0	0
ML 64	1	<1%	<1%	0	0	<1%	<1%	0	0	0	0
ML 65	1	1	<1%	0	0	0	1	0	0	0	0
ML 66	1	<1%	<1%	0	0	0	1	0	0	0	0
ML 67	1	<1%	<1%	0	0	0	1	0	0	0	0
ML 68	2	1	<1%	0	0	0	1	0	0	0	0
ML 69	2	<1%	0	0	0	<1%	1	0	0	0	0
ML 70	2	1	0	0	0	<1%	<1%	0	0	0	0
ML 71	1	1	1	0	0	<1%	1	0	0	0	0
ML 72	1	<1%	1	0	0	<1%	1	0	0	0	0
ML 73	1	1	<1%	0	0	<1%	1	0	0	0	0
ML 74	1	1	<1%	0	0	<1%	<1%	0	0	0	0
ML 75	1	<1%	<1%	0	0	<1%	1	0	0	0	0
ML 76	1	<1%	0	0	0	<1%	<1%	0	0	0	0



Tabla A. 10. Abundancia relativa de bacterias nitrificantes en el reactor ML determinada con Illumina

	Género (% abundancia relativa)				
	<i>Nitrosomonas</i>	<i>Nitrospira</i>	<i>Candidatus Nitrotoga</i>	<i>Nitrosospira</i>	<i>Nitrobacter</i>
ML 1	0,445	0,762	0,000	0,000	0,000
ML 3	0,472	0,408	0,000	0,000	0,000
ML 5	0,000	0,032	0,000	0,000	0,000
ML 7	0,830	0,150	0,000	0,000	0,000
ML 9	0,467	0,082	0,018	0,000	0,000
ML 11	0,599	0,181	0,001	0,000	0,000
ML 13	0,762	0,132	0,154	0,000	0,000
ML 15	0,417	0,073	0,132	0,000	0,000
ML 17	0,535	0,032	0,141	0,000	0,000
ML 19	0,186	0,095	0,077	0,000	0,000
ML 21	0,145	0,104	0,064	0,000	0,000
ML 23	0,553	0,236	0,141	0,000	0,000
ML 25	0,240	0,263	0,041	0,000	0,000
ML 27	0,939	0,318	0,145	0,000	0,000
ML 29	1,093	0,059	0,118	0,000	0,000
ML 31	0,540	0,032	0,127	0,000	0,000
ML 33	0,689	0,032	0,100	0,000	0,000
ML 35	0,807	0,000	0,109	0,000	0,000
ML 37	0,776	0,014	0,023	0,014	0,000
ML 39	0,880	0,014	0,001	0,000	0,000
ML 41	0,531	0,001	0,000	0,000	0,000
ML 43	0,172	0,000	0,000	0,000	0,000
ML 45	0,200	0,000	0,014	0,000	0,000
ML 47	0,372	0,000	0,000	0,000	0,000

Tabla A. 11. Abundancia relativa de bacterias nitrificantes a nivel de género en el reactor ML determinada con PacBio

Género (% abundancia relativa)			
	<i>Nitrosomonas</i> spp.	<i>Nitrospira</i> spp.	<i>Candidatus</i> <i>Nitrotoga</i>
ML 1	0,120	6,140	0,020
ML 9	0,300	1,240	0,000
ML 17	0,130	0,110	0,110
ML 25	0,100	1,040	0,010
ML 33	0,980	0,000	0,350
ML 43	0,470	0,660	0,000
ML 51	0,730	0,000	0,000

Tabla A. 12. Abundancia relativa de bacterias nitrificantes a nivel de especie en el reactor ML determinada con PacBio

Especies (% abundancia relativa)								
	<i>N. marina</i>	<i>Nitrosomonas</i> sp.	<i>N. aestuarii</i>	<i>Candidatus</i> <i>Nitrospira</i>	<i>Candidatus</i> <i>Nitrospira</i> <i>defluvii</i>	<i>Nitrospira</i> sp.	<i>Nitrospira</i> cf. <i>moscoviesis</i>	<i>Candidatus</i> <i>Nitrotoga</i>
ML 1	0,020	0,020	0,090	0,390	0,790	4,170	0,390	0,020
ML 9	0,080	0,090	0,140	0,080	0,150	0,860	0,080	0,000
ML 17	0,020	0,030	0,070	0,010	0,020	0,070	0,010	0,110
ML 25	0,020	0,020	0,050	0,070	0,140	0,680	0,070	0,010
ML 33	0,260	0,230	0,490	0,000	0,000	0,000	0,000	0,350
ML 43	0,080	0,120	0,270	0,040	0,080	0,470	0,040	0,000
ML 51	0,160	0,100	0,470	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

## ANEXO 4. TASAS DE RESPIRACIÓN DE LAS BACTERIAS NITRIFICANTES DETERMINADAS MEDIANTE RESPIROMETRÍA

Tabla A. 13. Tasas de respiración medidas en la EDAR ML

MUESTRA	OUR <sub>end,max</sub> mgO <sub>2</sub> /l/h	SOUR <sub>end,max</sub> mgO <sub>2</sub> /gSSVLM·h	OUR <sub>end,H</sub> mgO <sub>2</sub> /l/h	SOUR <sub>H</sub> mgO <sub>2</sub> /gSSVLM·h	OUR <sub>end,A</sub> mgO <sub>2</sub> /l/h	SOUR <sub>A</sub> mgO <sub>2</sub> /gSSVLM·h	Rs <sub>max</sub> mgO <sub>2</sub> /l/h	Rsp mgO <sub>2</sub> /gSSVLM·h	AUR mgNH <sub>4</sub> /l/h	AURp mgNH <sub>4</sub> /gSSVLM·h
ML-23	27,93	4,704	15,06	2,536	12,87	2,17	2,536	0,85	0,55	0,19
ML-25	23,51	5,625	23,53	5,63	0,00	0,00	1,39	0,67	0,30	0,15
ML-26	13,39	2,846	11,11	2,36	2,29	0,49	12,57	5,34	2,75	1,17
ML-28	16,01	3,351	11,80	2,47	4,21	0,88	24,1	10,09	5,27	2,21
ML-31	19,55	3,597	11,99	2,206	7,56	1,39	18,86	6,94	4,13	1,52
ML-33	17,98	3,22	14,24	2,55	3,74	0,67	23,23	8,32	5,08	1,82
ML-35	19,41	4,24	16,39	3,58	3,02	0,66	31,61	13,81	6,92	3,02
ML-36	24,08	4,94	21,65	4,44	2,44	0,50	29,64	12,16	6,49	2,66
ML-37	20,94	4,774	16,39	3,736	4,55	1,04	20,1	9,17	4,40	2,01
ML-38	25,81	5,186	19,82	3,983	5,99	1,20	24,52	9,86	5,37	2,16
ML-40	32,73	6,624	19,95	4,038	12,78	2,59	25,14	10,18	5,50	2,23
ML-50	21,74	3,28	14,69	2,22	7,04	1,06	26,04	7,87	5,70	1,72
ML-51	20,68	3,20	17,38	2,69	3,29	0,51	33,22	10,28	7,27	2,25
ML-52	27,6	3,80	20,24	2,79	7,35	1,01	19,76	5,45	4,32	1,19
ML-53	16,52	3,32	14,10	2,83	2,41	0,49	19,56	7,86	4,28	1,72
ML-54	13,92	2,79	10,77	2,16	3,14	0,63	24,76	9,92	5,42	2,17
ML-55	14,16	2,98	10,56	2,22	3,59	0,76	38,32	16,13	8,39	3,53
ML-56	15,72	3,22	11,90	2,44	3,81	0,78	53,3	21,85	11,66	4,78
ML-57	12,6	2,57	8,86	1,81	3,73	0,76	21,56	8,79	4,72	1,92
ML-58	17,96	2,74	12,45	1,90	5,47	0,83	19,46	5,93	4,26	1,30
ML-59	14,16	2,31	9,31	1,52	4,84	0,79	36,82	12,01	8,06	2,63
ML-60	16,17	2,76	11,14	1,90	5,03	0,86	28,47	9,73	6,23	2,13

MUESTRA	OUR <sub>rend,max</sub> mgO <sub>2</sub> /l/h	SOUR <sub>rend,max</sub> mgO <sub>2</sub> /gSSVLM·h	OUR <sub>rend,H</sub> mgO <sub>2</sub> /l/h	SOUR <sub>H</sub> mgO <sub>2</sub> /gSSVLM·h	OUR <sub>rend,A</sub> mgO <sub>2</sub> /l/h	SOUR <sub>A</sub> mgO <sub>2</sub> /gSSVLM·h	RS <sub>max</sub> mgO <sub>2</sub> /l/h	Rsp mgO <sub>2</sub> /gSSVLM·h	AUR mgNH <sub>4</sub> /l·h	AURp mgNH <sub>4</sub> /gSSVLM·h
ML-61	18,73	3,43	13,98	2,56	4,75	0,87	17,93	6,57	3,92	1,44
ML-62	25,32	5,13	17,14	3,47	8,18	1,66	20,66	8,36	4,52	1,83
ML-63	18,64	3,98	11,84	2,53	6,79	1,45	10,56	4,51	2,31	0,99
ML-65	13,98	3,27	9,21	2,16	4,76	1,12	47,6	22,27	10,42	4,87
ML-66	27,32	5,91	8,12	1,76	19,19	4,15	42,86	18,56	9,38	4,06
ML-67	22,84	4,73	13,60	2,82	9,23	1,91	22,52	9,33	4,93	2,04
ML-68	22,98	4,44	12,30	2,38	10,67	2,06	24	9,28	5,25	2,03
ML-69	15,06	3,45	11,14	2,55	3,91	0,90	34,36	15,72	7,52	3,44
ML-70	17,18	3,76	12,98	2,84	4,19	0,92	17,06	7,46	3,73	1,63
ML-71	17,84	3,91	13,20	2,90	4,63	1,02	14,36	6,30	3,14	1,38
ML-72	21,36	4,99	10,92	2,55	10,43	2,44	4,2	1,96	0,92	0,43

## ANEXO 5. RESUMEN ESTADÍSTICO. VARIABLES FISICOQUÍMICAS Y PARÁMETROS OPERACIONALES

Tabla A. 14. Resumen estadístico de las variables fisicoquímicas y operacionales de interés para el estudio en la EDAR CX, DN y QB

	Unidades	Reactor CX				Reactor DN				Reactor QB			
		Mínimo	Máximo	Media	DE	Mínimo	Máximo	Media	DE	Mínimo	Máximo	Media	DE
TRC	días	3,3	19,3	7,2	4,4	9,6	109,4	25,9	22,9	5,2	29,0	10,6	5,7
CM	Kg DBO <sub>5</sub> /Kg SSVLM.d	0,10	0,51	0,31	0,11	0,09	0,24	0,14	0,04	0,08	0,33	0,18	0,07
CM(DQO)	Kg DQOs/Kg SSVLM.d	0,07	0,34	0,20	0,08	0,02	0,14	0,08	0,02	0,10	0,49	0,18	0,09
TRHr	horas	5,61	6,90	6,53	0,39	12,35	18,86	14,98	1,92	14,82	24,37	18,33	2,32
TRHds	horas	8,10	10,00	9,41	0,54	5,50	8,40	6,64	0,85	4,25	8,66	6,11	1,34
T <sup>r</sup>	°C	15,00	26,60	20,63	3,51	10,80	25,50	18,74	4,17	14,40	28,50	21,44	3,72
ODb	%	0,00	17,00	0,85	3,80	41,00	78,00	65,05	10,86	0,00	92,00	36,21	25,47
ODm	%	0,00	35,00	2,40	7,94	22,00	59,00	33,64	10,64	8,00	96,00	60,79	23,98
ODa	%	48,00	100,00	96,75	11,66	0,00	9,00	1,32	2,30	0,00	35,00	3,04	9,56
pHLM	Ud	7,00	7,88	7,42	0,19	6,92	8,00	7,40	0,26	7,05	7,79	7,44	0,19
Cond LM	μS/cm	946	2540	1618	369	986	5440	2853	1020	1330	2740	2043	434
SSLM	mg/L	1100	2980	1903	548	2500	3780	3229	296	1790	3120	2435	373
%SSVLM	%	70,00	91,00	82,65	4,72	62,00	74,80	69,58	3,25	68,00	87,00	79,08	3,71
IVF	mg/L	73,83	200,00	111,18	29,74	85,11	140,00	110,07	15,06	59,00	167,00	119,38	27,62
%DQOs	%	7,83	44,55	29,27	9,09	15,03	64,34	36,24	13,14	41,74	75,38	52,02	8,22
DQO/DBO	-	1,60	3,46	2,15	0,45	1,38	2,26	1,90	0,29	1,43	2,33	1,75	0,20
NT	g/Kg SSVLM.d	40,64	185,99	115,89	47,34	18,62	62,02	37,77	10,73	28,76	102,00	49,81	20,25
N-NH <sub>4</sub>	g/Kg SSVLM.d	14,42	100,33	63,14	24,31	4,76	33,72	20,03	8,20	14,42	100,33	60,89	23,68
N-NH <sub>4</sub>	mg/L	7,10	41,00	25,70	7,50	5,30	56,00	27,00	13,00	24,00	62,00	40,00	12,00
PT	g/Kg SSVLM.d	3,77	30,12	15,29	7,32	0,69	5,96	3,46	1,14	2,23	8,99	4,92	1,98
P-PO <sub>4</sub>	g/Kg SSVLM.d	2,21	19,27	11,39	4,95	0,56	4,44	2,29	0,98	2,23	8,99	4,92	1,98

Tabla A. 15. Resumen estadístico de las variables fisicoquímicas y operacionales de interés para el estudio en la EDAR CT

	Unidades	Reactor CT1				Reactor CT2			
		Mínimo	Máximo	Media	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Estándar
TRC	días	3,1	9,4	5,7	1,6	3,4	37,3	8,0	7,3
CM	Kg DBO <sub>5</sub> /Kg SSVLM.d	0,12	0,65	0,28	0,10	0,13	0,60	0,25	0,11
CM(DQO)	DQOs/Kg SSVLM.d	0,15	0,37	0,26	0,06	0,11	0,42	0,23	0,08
TRHr	horas	4,63	6,51	5,53	0,54	4,87	6,23	5,40	0,38
TRHds	horas	4,10	5,80	4,97	0,48	4,70	6,30	5,28	0,44
T <sup>ar</sup>	°C	15,60	28,50	22,05	3,96	15,40	29,10	22,09	4,05
ODb	%	0,00	25,00	1,70	5,28	0,00	51,00	7,09	12,66
ODm	%	0,00	94,00	45,91	27,83	11,00	69,00	44,57	16,68
ODa	%	6,00	100,00	52,43	29,67	11,00	89,00	48,43	23,07
pHLM	Ud	6,65	7,51	7,17	0,20	6,85	7,60	7,20	0,21
Cond LM	µS/cm	1875	4850	2968	761	1895	4840	2906	691
SSLM	mg/L	2640	6240	4055	1048	2460	6800	4127	1157
%SSVLM	%	64,00	78,00	72,04	3,20	61,00	81,00	72,22	4,74
IVF	mg/L	81,14	160,64	109,50	19,97	64,00	160,00	108,74	28,71
%DQOs	%	24,40	65,96	45,28	10,26	14,97	62,16	38,43	12,64
DQO/DBO	-	1,63	3,13	2,14	0,38	1,23	3,28	2,15	0,56
NT	g/Kg SSVLM.d	38,19	147,09	91,97	22,03	47,60	163,41	94,56	33,92
N-NH4	g/Kg SSVLM.d	33,95	121,35	73,29	17,22	31,73	117,15	69,53	22,96
N-NH4	mg/L	32,00	66,00	46,60	7,60	32,00	66,00	45,40	9,50
PT	g/Kg SSVLM.d	5,94	36,77	16,39	6,22	7,41	34,94	17,77	8,03
P-PO4	g/Kg SSVLM.d	4,16	30,06	12,11	4,98	4,93	19,49	11,57	4,25

Tabla A. 16. Resumen estadístico de las variables fisicoquímicas y operacionales de interés para el estudio en la EDAR ML

		Reactor ML			
					Desviación
	Unidades	Mínimo	Máximo	Media	Estándar
TRC	días	6,4	32,3	12,9	4,8
CM	Kg DBO <sub>5</sub> /Kg SSVLM.d	0,0	0,3	0,1	0,0
CM(DQOs)	Kg DQOs/Kg SSVLM.d	0,0	0,3	0,1	0,1
TRHr	horas	8,4	23,8	19,3	2,4
TRHds	horas	5,8	16,3	13,2	1,7
T <sup>r</sup>	°C	15,3	31,5	23,9	4,6
ODb	%	0	0	0	0
ODm	%	0	0	0	0
ODa	%	100	100	100	0
pH	Ud	6,97	8,01	7,20	0,21
CondLM	μS/cm	987	5540	2764	1001
SSLM	mg/L	4040	8505	5787	825
%SSVLM	%	80,0	92,0	87,2	2,6
IVF	mg/L	22,0	116,0	58,4	15,9
%DQOs	%	30,0	99,0	69,0	12,4
DQO/DBO	-	1,1	2,3	1,5	0,3
N-NH <sub>4</sub>	g/Kg SSVLM.d	4,1	17,7	10,0	3,4
N-NH <sub>4</sub>	g/Kg SSVLM.d	10,0	55,0	38,9	12,1
CPTs	g/Kg SSVLM.d	0,1	2,0	1,2	0,4

## ANEXO 6. RESUMEN ESTADÍSTICO. CALIDAD DEL EFLUENTE Y RENDIMIENTOS DE ELIMINACIÓN

Tabla A. 17. Rango, media y desviación estándar de las fracciones del nitrógeno en el efluente y sus respectivos rendimientos de eliminación.

	Reactor CX					Reactor DN				Reactor QB			
	Unidades	Mínimo	Máximo	Media	Desviación	Mínimo	Máximo	Media	Desviación	Mínimo	Máximo	Media	Desviación
					Estandar				Estandar				Estandar
NTs	mg/L	8,9	38,9	22,1	7,7	3,3	9,4	6,4	1,6	5,6	45,0	19,0	11,5
rNTs	%	21,47	67,23	50,05	13,43	69,05	91,44	82,79	5,53	28,22	83,03	59,79	14,64
N-NH4	mg/L	0,06	19,00	4,54	6,72	0,03	1,22	0,17	0,27	0,10	32,60	9,55	9,74
rN-NH4	%	18,52	99,61	83,70	23,95	89,39	99,90	99,02	2,24	41,88	99,60	78,88	18,61
N-NO2	mg/L	0,02	1,83	0,67	0,52	0,00	0,32	0,05	0,07	0,04	5,67	1,35	1,50
N-NO3	mg/L	6,53	18,50	11,91	3,48	1,71	7,15	3,91	1,74	0,36	11,10	6,14	2,67
NKTs	mg/L	1,44	29,86	9,55	8,29	0,45	4,78	2,45	1,06	0,98	35,95	11,45	10,54
rNKTs	%	20,68	87,79	62,10	20,26	82,96	99,12	93,29	3,50	44,69	96,39	77,47	16,91
%N-NO2	%	0,16	13,74	5,50	4,15	0,05	5,21	1,24	1,40	1,07	50,31	16,40	12,78

	Reactor CT1				Reactor CT2				Reactor ML				
	Unidades	Mínimo	Máximo	Media	Desviación	Mínimo	Máximo	Media	Desviación	Mínimo	Máximo	Media	Desviación
					Estandar				Estandar				Estandar
NTs	mg/L	17,0	53,0	33,1	11,0	20,0	48,0	32,0	7,7	31,9	2,6	8,7	3,8
rNTs	%	4,00	60,47	36,03	13,95	20,00	57,14	36,52	10,02	96,00	19,00	81,60	10,40
N-NH4	mg/L	4,40	45,00	26,50	11,84	15,00	42,00	26,83	7,98	29,30	0,20	3,10	4,00
rN-NH4	%	10,20	89,52	44,20	20,68	14,58	63,16	41,05	11,77	99,70	0,00	91,00	14,00
N-NO2	mg/L	0,00	5,20	2,03	1,69	0,00	3,20	1,31	0,88	2,50	0,00	0,80	0,70
N-NO3	mg/L	0,50	4,70	1,45	1,25	0,50	3,60	1,66	1,03	8,80	0,50	3,50	2,20
NKTs	mg/L	12,10	52,31	29,65	12,60	16,00	46,10	28,99	8,49	28,80	0,00	4,50	3,60
rNKTs	%	5,26	71,40	43,41	17,88	22,91	61,69	42,93	10,73	100,00	27,00	90,60	8,90
%N-NO2	%	0,60	91,07	52,21	23,79	0,50	6,80	2,97	1,72	72,00	2,00	20,00	18,20



## ANEXO 7. CALIDAD DEL EFLUENTE, RENDIMIENTOS DE ELIMINACIÓN, VARIABLES FISICOQUÍMICAS Y PARÁMETROS OPERACIONALES MEDIDOS EN LA EDAR ML

Tabla A. 18., Variables fisicoquímicas y parámetros operacionales medidos en la EDAR ML

	TRHr	TRHds	%QrecEX	%QrecIN	SSLM	IVF	%SSVLM	SSVLM	T*r	DQOs/NTs	%DQOs	DQO/DBO	DBO5	DOOs	DQOp	Rrec	TRC	CM	CM(DQOs)	CPTs	CN-NH4
ML-1	21,25	14,55	150	211	4410	54	88	3881	31,4	17,22	82,03	1,27	860	899	197	2,12	32,3	0,21	0,21	1,29	15,28
ML-2	21,85	14,95	98	174	4855	52	90	4351	30,2	12,14	65,94	1,05	698	482	249	1,59	17,4	0,11	0,09	1,52	13,17
ML-3	21,55	14,75	93	174	5120	82	91	4659	31	19,53	93,78	1,19	929	1041	69	2,64	15,3	0,17	0,17	1,17	12,1
ML-4	20,33	13,91	98	169	5950	64	91	5415	30,7	16,81	76,08	1,24	900	849	267	2,12	12	0,17	0,14	0,93	10,62
ML-5	23,79	16,28	75	151	5600	47	90	5040	29,4	11,36	77,16	1,56	700	841	249	2,12	10,4	0,14	0,15	1,35	17,33
ML-6	19,39	13,27	87	158	5450	50	91	4960	28,3	15,02	72,65	2,32	450	757	285	2,27	9,2	0,15	0,14	0,81	9,84
ML-7	20,02	13,7	99	164	4945	34	85	4203	29,3	15,4	79,62	1,37	800	875	224	2,3	8,8	0,23	0,23	1,38	14,79
ML-8	21,45	14,68	105	172	5000	32	90	4500	27,7	12,33	72,68	1,42	623	641	241	2,24	11,8	0,18	0,18	1,25	11,5
ML-9	21,54	14,74	104	171	5135	49	90	4622	25,4	12,28	72,93	1,46	750	800	297	2,22	10,3	0,15	0,16	1,37	14,34
ML-10	21,44	14,67	88	221	4985	70	88	4387	23,2	24,44	95,57	1,46	757	1056	49	2,37	11	0,19	0,23	0,95	9,26
ML-11	15,7	10,74	53	117	4865	70	90	4380	21,1	15,7	69,68	1,32	585	540	235	3,36	10	0,22	0,23	1,19	14,77
ML-12	17,11	11,71	61	179	5585	66	89	4971	21,5	10,82	70,07	1,34	700	658	281	2,73	8,5	0,16	0,16	0,82	12,36
ML-13	17,4	11,91	67	168	4160	66	87	3619	22,1	23,95	97,13	1,13	1020	1116	33	3,77	9,3	0,22	0,22	1,72	13,42
ML-14	8,4	5,75	67	95	5380	89	89	4813	15,3	3,12	58,58	1,63	82	78,5	55,5	2,51	13,4	0,07	0,08	0,36	5,72
ML-15	19,12	13,09	88	186	5735	64	84	4794	19,5	15,52	77,88	1,33	780	810	230	2,04	10,7	0,11	0,12	0,92	11,85
ML-16	19,3	13,21	79	199	6400	70	85	5440	18,6	9,19	69,62	1,53	450	479	209	2,09	13,1	0,12	0,13	0,82	10,05
ML-17	16,02	10,96	86	168	6170	73	85	5245	17,2	15,11	70,24	1,7	500	597	253	2,15	12,2	0,12	0,12	0,51	12,35
ML-18	18,77	12,85	100	196	6525	71	86	5612	19,8	14,12	66,21	1,93	418	535	273	1,79	14,1	0,08	0,09	0,69	7,11
ML-19	18,14	12,42	108	195	6345	63	85	5393	19,4	17,58	67,77	2,22	420	633	301	1,94	14,5	0,09	0,12	0,82	4,98
ML-20	18,1	12,38	87	162	6465	58	85	5495	19,1	13,73	66,97	1,45	600	582	287	1,66	13,9	0,13	0,11	1,08	4,84
ML-21	18,45	12,62	70	145	6585	60	86	5663	19	11,98	83,53	1,25	480	502	99	1,94	14,5	0,1	0,1	0,74	5,53
ML-22	19,77	13,53	136	173	6000	41	85	5100	20,5	5,13	62,5	1,78	180	200	120	1,82	14,1	0,04	0,04	0,6	7,35
ML-23	18,58	12,71	118	197	6825	49	83	5665	20,6	18,07	68,4	1,42	730	710	328	1,71	15,7	0,12	0,12	1,52	4,98
ML-24	11,65	7,97	83	125	5681	42	84	4758	16,8	10,19	72,92	1,44	399	420	156	2,34	11,5	0,16	0,17	1,96	8,9
ML-25	16,97	11,61	114	112	4725	54	80	3780	19,2	13,97	68,28	1,39	580	549	255	2,26	11,1	0,16	0,15	0,77	8,16
ML-26	16,86	11,54	127	170	5475	56	82	4490	19,3	6,93	57,68	1,72	280	278	204	1,91	12,7	0,08	0,08	0,73	9,93
ML-27	17,65	12,08	118	208	5890	58	83	4889	20,1	5,69	44,78	2,26	220	223	275	1,77	13,4	0,09	0,09	1,19	9,19
ML-28	18,34	12,55	135	220	5660	70	84	4736	22,2	8,26	54,3	1,07	600	347	292	1,6	14,2	0,11	0,09	1,23	8,14
ML-29	19,77	13,53	138	239	5900	76	84	4956	21,7	3,99	45,96	1,94	166	148	174	1,8	11,7	0,05	0,04	0,56	7,39
ML-30	18,47	12,64	113	212	5975	69	84	5019	24	8,46	44,1	1,31	542	314	398	2,08	10,4	0,13	0,09	1,08	7,99
ML-31	17,88	12,24	107	199	6035	74	85	5130	24,8	6,37	30,04	1,61	510	246	573	2,27	9,9	0,13	0,08	1,4	7,46

	TRHr	TRHds	%QrecEX	%QrecIN	SSLM	IVF	%SSVLM	SSVLM	T*r	DQOs/NTs	%DQOs	DQO/DBO	DBO5	DOOs	DQOp	Rrec	TRC	CM	CM(DQOs)	CPTs	CN-NH4
ML-32	19,12	13,08	118	222	6655	65	85	5679	25,6	9,43	47,54	1,35	512	328	362	1,78	9,1	0,09	0,06	1,12	4,08
ML-33	19,68	13,46	108	220	6395	58	86	5520	26,3	25,25	72,88	1,53	601	669	249	1,84	9,3	0,12	0,1	1,34	4,12
ML-34	19,96	13,66	116	239	5700	54	86	4923	27,2	12,41	71,88	1,49	639	685	268	1,94	9,9	0,12	0,13	1,5	4,63
ML-35	22,28	15,25	113	194	5335	60	86	4565	27,2	13,13	68,97	1,12	687	529	238	1,79	10,8	0,12	0,09	1,47	5,97
ML-36	20,27	13,87	119	246	5165	50	88	4525	29	7,71	68,99	1,61	480	534	240	1,8	10,6	0,15	0,15	1,58	12,97
ML-37	20,61	14,1	121	184	5555	60	87	4835	30,5	4,25	48,46	1,86	330	298	317	1,82	10,3	0,1	0,09	1,54	12,5
ML-38	21,72	14,86	125	222	5550	42	87	4846	29,3	10,86	72,13	1,34	670	647	250	1,91	10,3	0,15	0,11	1,46	11,2
ML-39	21,91	14,99	131	264	5140	43	85	4369	29,9	9,67	70,07	1,45	581	590	252	2,1	10,2	0,14	0,14	1,71	10,72
ML-40	23,09	15,8	116	181	5605	41	85	4747	31,5	5,83	53,85	1,63	400	350	300	1,61	10,3	0,09	0,09	1,67	10,79
ML-41	20,91	14,31	115	197	5830	42	86	5037	31,5	13,5	73,04	1,38	805	810	299	1,8	11	0,18	0,19	1,59	10,38
ML-42	19,42	13,29	134	167	4040	37	90	3619	30,3	16,18	69,7	1,32	827	759	330	1,31	26,5	0,22	0,22	1,62	14,08
ML-43	20,22	13,83	190	187	5725	47	91	5195	29,6	32,65	99,01	1,33	830	1097	11	1,26	19,2	0,21	0,26	0,67	6,93
ML-44	20,29	13,89	227	219	6400	44	91	5824	29,9	13,08	66,37	1,58	500	523	265	1	16,2	0,1	0,1	0,71	6,66
ML-45	19,25	13,17	178	177	6695	50	91	6122	29	14,22	67,92	1,5	800	815	385	1,1	19,4	0,15	0,14	0,96	10,8
ML-46	19,98	13,67	184	187	6580	48	92	6029	29,3	31,6	71,05	1,59	710	800	326	1,81	13,2	0,11	0,11	0,79	5,01
ML-47	19,99	13,68	243	182	6785	52	91	6175	28,8	11,82	70,21	1,71	650	780	331	1,98	9,6	0,09	0,13	0,97	9,44
ML-48	21,35	14,61	260	175	6975	57	91	6333	27,8	11,95	70,16	1,68	670	790	336	1,8	9,5	0,13	0,13	0,97	9,74
ML-49	21,73	14,87	247	182	7330	52	91	6670	26,1	12,77	82,97	1,3	860	926	190	2,02	8,7	0,15	0,16	1,15	10,43
ML-50	21,01	14,38	227	189	7380	50	91	6739	24,1	12,24	75,18	1,26	900	851	281	1,9	9,2	0,12	0,13	1,07	10
ML-51	21,4	14,64	206	173	7180	45	90	6470	23,4	13,84	90,99	1,27	875	1010	100	1,86	10	0,11	0,12	1,04	11,79
ML-52	22,08	15,11	254	210	8505	37	89	7569	24	11,58	67,23	1,26	850	720	351	1,84	10,7	0,08	0,09	0,89	4,99
ML-53	19,64	13,44	167	99	5925	63	86	5096	21,2	11,42	69,25	1,28	800	707	314	2,66	8,1	0,16	0,15	1,59	17,08
ML-54	20,44	13,99	206	214	5720	63	89	5085	19,6	11,69	67,14	1,54	680	705	345	2,55	7,3	0,13	0,12	1,36	9,51
ML-55	19,13	13,09	246	224	5550	96	88	4890	19,1	11,94	67,62	2,15	502	731	350	2,67	6,7	0,15	0,18	1,44	12,43
ML-56	18,29	12,52	175	148	5600	98	87	4872	17,4	17,35	80,25	1,26	877	890	219	2,59	6,4	0,23	0,24	1,69	11,42
ML-57	21,15	14,48	210	208	5565	116	90	4988	20	13,02	81,83	1,34	810	887	197	2,53	7,5	0,15	0,16	1,65	17,73
ML-58	15,89	10,87	222	203	7710	74	88	6775	17,3	13,84	72,34	1,57	580	659	252	2,26	8,3	0,09	0,11	0,46	6,93
ML-59	20,19	13,82	208	181	7210	91	88	6309	18,6	6,88	44	2,19	342	330	420	1,89	7,9	0,09	0,05	0,79	5,87
ML-60	20,67	14,14	211	194	6600	59	87	5742	18	14,14	69,61	1,31	780	710	310	1,3	13,1	0,09	0,09	1,08	6,91
ML-61	19,35	13,24	278	203	6395	68	88	5644	19,2	12,96	65,6	1,7	494	551	289	1,23	15,8	0,09	0,1	1,25	6,38
ML-62	21,99	15,05	255	212	5360	63	87	4641	20,4	9,82	69,25	1,35	700	653	290	1,39	14,7	0,09	0,11	1,25	14,76
ML-63	16,13	11,04	193	173	5395	74	87	4706	19	11,98	76,96	1,65	563	715	214	1,46	14	0,13	0,15	1,45	15,46
ML-64	18,63	12,75	261	158	5440	65	86	4685	19,8	13,74	64,8	1,4	700	635	345	1,32	13,6	0,13	0,12	1,57	10,6
ML-65	21,38	14,63	202	194	4900	68	87	4263	19,1	5,29	53,01	2,14	256	291	258	1,41	15,1	0,07	0,08	1,48	14,25
ML-66	21,48	14,7	216	177	5200	64	87	4520	21,2	14,06	69,12	1,5	750	779	348	1,3	14	0,16	0,17	1,79	12,74
ML-67	17,14	11,73	216	193	5570	47	87	4829	21,6	10,6	69,04	1,53	550	582	261	1,51	14,3	0,19	0,19	1,44	9,05
ML-68	18,75	12,83	143	170	5925	54	87	5170	23,1	17	68,85	1,4	816	787	356	1,47	14,6	0,14	0,12	1,36	8,56

	TRHr	TRHds	%QrecEX	%QrecIN	SSLM	IVF	%SSVLM	SSVLM	T*r	DQOs/NTs	%DQOs	DQO/DBO	DBO5	DOOs	DQOp	Rrec	TRC	CM	CM(DQOs)	CPTs	CN-NH4
ML-69	19,45	13,31	142	120	5500	55	86	4730	22,3	4,86	59,83	1,47	322	283	190	1,56	13,2	0,09	0,08	1,43	13,73
ML-70	19,64	13,44	177	138	5340	53	87	4645	23,8	10,6	59,27	1,35	750	598	411	3,37	13,5	0,15	0,12	1,52	12,01
ML-71	18,36	12,56	159	171	5395	44	87	4667	23,7	14,98	59,75	1,62	698	677	456	3,3	12,2	0,15	0,13	1,33	8,84
ML-72	18,23	12,48	100	146	4820	50	85	4105	25,8	8,33	62,34	1,73	450	485	293	3,77	13,2	0,2	0,19	1,94	12,18
ML-73	13,13	8,98	189	129	4275	54	82	3520	24,4	17,97	72,3	1,36	757	744	285	2,06	17,3	0,32	0,29	1,38	11,12
ML-74	18,11	12,39	135	162	5445	52	85	4655	25,8	14,74	70,54	1,3	700	644	269	0,86	27	0,2	0,18	1,18	7,98
ML-75	18,95	12,97	196	175	5295	42	87	4615	27,7	22,2	90,31	1,24	890	997	107	1,17	26,7	0,18	0,18	1,51	9,67
ML-76	19,66	13,46	206	216	5340	22	88	4699	28,4	13,58	67,82	1,21	741	607	288	1,38	24,6	0,16	0,14	1,77	10,38

Tabla A. 19. Calidad del efluente y rendimientos de eliminación de contaminantes en la EDAR ML

	NT	NTs	NKT	N-NH4	N-NO2	N-NO3	PT	PTs	P-PO4	SST	DQO	DQOs	DBO5	NKTs	rSST	rDQO	rDQOs	rDBO5	rNKTs	rNTs	rPTs	%N-NO2	rN-NH4
ML-1	4,9	3,96	2,82	1,5	0,08	2	1,2	0,43	0,36	5	44	43	17	1,88	98	96	95	98	96	92	92	4	96,72
ML-2	12,1	8,9	7,69	4,91	2,1	2,31	0,82	0,76	0,51	8	45	41	20	4,49	96	94	92	97	89	78	87	48	90,35
ML-3	6,8	6,02	4,79	2,01	0,64	1,37	0,28	0,26	0,12	6	38	29	15	4,013	98	97	97	98	92	89	95	32	95,78
ML-4	8,11	7,94	5,67	4,64	1,13	1,31	0,15	0,14	0,11	6	36	29	7	5,5	96	97	97	99	89	84	96	46	90,45
ML-5	9,54	9,54	6,42	4,16	1,47	1,65	0,17	0,11	0,09	5	38	39	8	6,42	97	97	95	99	91	87	98	47	93,32
ML-6	3,9	8,74	1,92	0,65	0,08	1,9	0,21	0,11	0,1	5	40	35	12	6,76	97	96	95	98	87	83	97	4	98,33
ML-7	7,79	10,2	3,46	4,82	2,5	1,83	0,63	0,33	0,3	14	68	47	20	5,87	93	94	95	98	90	82	93	58	90,97
ML-8	8,9	7,12	6,59	4,6	0,81	1,5	2,45	2,13	2,07	10	64	45	18	4,81	94	93	93	97	91	86	56	35	90,13
ML-9	11,1	8,64	8,52	4,47	1,86	0,72	3,57	3,3	3,62	7	41	32	10	6,063	92	96	96	99	91	88	33	72	92,20
ML-10	5,8	4,82	3,7	1,82	0,11	1,99	0,92	0,79	0,69	6	35	30	1	2,72	96	97	97	100	94	89	76	5	95,16
ML-11	10,2	9,82	8,62	6,01	0,66	0,92	0,45	0,33	0,25	7	36	29	3	8,239	96	95	95	100	76	71	82	42	79,83
ML-12	9,58	8,12	4,84	1,92	2,45	2,29	0,35	0,3	0,24	6	35	32	11	3,38	96	96	95	98	94	87	91	52	95,52
ML-13	14,6	12,9	12,4	8,13	1,2	1	3,66	3,17	3,08	6	47	13	9	10,7	97	96	99	99	77	72	15	55	75,80
ML-14	4,1	2,95	2,69	1,25	0,21	1,2	0,31	0,16	0,14	6	30	20	5	1,54	90	78	75	94	94	88	59	15	87,49
ML-15	6,8	5,2	2,38	0,87	0,32	4,1	1,51	1,34	1,18	6	33	29	4	0,78	96	97	96	99	99	90	60	7	98,02
ML-16	11,9	9,4	8,09	2,1	0,21	2,8	1,5	0,13	0,08	7	30	25	6	6,39	96	96	95	99	88	82	96	7	95,39
ML-17	10,9	9,81	6,96	2,8	0,14	3,5	0,66	0,03	0,04	7	38	26	6	6,17	95	96	96	99	84	75	99	4	93,58
ML-18	10	9,33	3,7	0,47	0,1	6,2	0,36	0,2	0,15	5	36	31	5	3,03	97	96	94	99	92	75	93	2	98,59
ML-19	9,8	8,7	3,18	1,89	0,12	6,5	0,54	0,3	0,26	6	28	26	5	2,08	97	97	96	99	94	76	89	2	90,94
ML-20	9,8	8,9	3,69	1,6	0,21	5,9	0,58	0,25	0,22	5	32	26	5	2,79	97	96	96	99	93	79	92	3	92,39
ML-21	8	6,4	4,28	3,1	0,12	3,6	0,44	0,3	0,29	6	38	28	5	2,68	96	94	94	99	94	85	90	3	85,97
ML-22	15,8	13,8	7,9	5,49	0,81	7,09	0,41	0,28	0,27	7	57	44	10	5,9	96	82	78	94	85	65	89	10	82,84

	NT	NTs	NKT	N-NH4	N-NO2	N-NO3	PT	PTs	P-PO4	SST	DQO	DQOs	DBO5	NKTs	rSST	rDQO	rDQOs	rDBO5	rNKTs	rNTs	rPTs	%N-NO2	rN-NH4
ML-23	11,7	10,5	5,96	2,94	0,54	5,2	1,51	1,42	1,39	7	62	52	11	4,76	96	94	93	98	88	73	68	9	85,66
ML-24	16,1	12,4	14,59	13,9	0,31	1,2	1,6	1,02	0,99	26	61	50	12	10,886	90	89	87	97	71	67	67	21	29,08
ML25	36,3	31,9	33,21	29,3	0,96	2,13	0,41	0,29	0,24	22	64	47	14	28,807	85	92	91	98	27	19	89	31	0,00
ML-26	11	10,2	6,48	4,36	0,25	4,27	0,45	0,32	0,32	15	48	45	8	5,68	93	90	84	97	86	75	86	6	86,71
ML-27	13,8	12,1	5,55	2,22	1,62	6,63	2,3	1,89	1,78	14	56	52	8	3,85	92	89	77	96	90	69	65	20	93,53
ML-28	6	4,5	1,9	0,36	0,12	4	0,45	0,31	0,24	10	38	35	6	0,38	95	94	90	99	99	89	93	3	98,84
ML-29	14	12,4	4,8	0,39	0,98	8,2	0,9	0,42	0,34	10	70	36	10	3,22	95	78	76	94	91	67	82	11	98,81
ML-30	5,2	6,43	2,2	0,65	0,12	2,9	0,39	0,09	0,07	8	39	32	14	3,41	97	95	90	97	91	83	98	4	97,92
ML-31	11,1	9,5	5,2	2,29	2,1	3,84	0,48	0,23	0,41	20	74	43	10	3,56	96	91	83	98	91	75	96	35	91,85
ML-32	5,2	6,3	1,9	0,69	0,21	3,1	0,79	0,11	0,05	8	38	32	10	2,99	97	94	90	98	91	82	98	6	96,41
ML-33	12,7	11,4	5,3	0,98	0,18	7,2	0,15	0,13	0,07	6	34	30	6	4,02	96	96	96	99	85	57	98	2	94,81
ML-34	8,4	7,9	4,6	1,62	2	1,83	0,38	0,13	0,06	19	36	28	8	4,07	91	96	96	99	93	86	98	52	91,78
ML-35	11,6	8,6	3,4	0,65	2,2	6	0,62	0,34	0,25	8	37	38	8	0,4	95	95	93	99	99	79	93	27	97,14
ML-36	7,2	5,3	3,7	1,58	1,8	1,75	0,44	0,29	0,28	16	53	44	8	1,75	89	93	92	98	97	92	95	51	96,83
ML-37	8,2	6,4	2,7	0,96	1,8	3,72	2,73	2,59	2,42	8	45	40	11	0,88	97	93	87	97	99	91	55	33	98,19
ML-38	5,4	4,2	1,7	0,45	0,08	3,6	2	1,8	1,7	6	48	45	9	0,52	96	95	93	99	99	93	70	2	99,07
ML-39	7,1	5,2	1,7	0,42	1,82	3,6	5,6	4,8	4,6	6	56	45	12	0	96	93	92	98	100	91	37	34	99,04
ML-40	7,8	5	6,4	2,87	0,65	0,79	0,3	0,25	0,2	6	24	21	8	3,558	98	96	94	98	94	92	96	45	93,62
ML-41	7,7	5	5,5	3	0,74	1,42	0,3	0,25	0,2	8	39	35	7	2,844	96	96	96	99	95	92	96	34	93,33
ML-42	6,1	4,9	4,2	2,29	0,41	1,5	0,4	0,3	0,23	6	38	33	18	2,99	97	97	96	98	94	90	94	21	94,35
ML-43	3,5	3	1,8	0,44	0,02	0,51	0,54	0,19	0,13	17	49	49	17	2,466	93	96	96	98	93	91	93	4	98,62
ML-44	6,3	6,01	3,9	2,04	0,81	1,55	0,36	0,17	0,25	17	46	36	7	3,65	89	94	93	99	91	85	96	34	94,46
ML-45	6,5	6,5	4,48	2,5	0,21	1,81	0,5	0,17	0,39	7	38	34	10	4,48	97	97	96	99	92	89	96	10	94,66
ML-46	7	6,1	4,79	2,29	0,51	1,7	0,41	0,27	0,22	7	38	35	8	3,89	98	97	97	99	89	83	90	23	92,05
ML-47	10,8	9,2	6,4	2,11	1,85	2,53	0,54	0,53	0,51	6	44	39	10	4,82	97	96	95	98	93	86	90	42	95,88
ML-48	7,1	6,1	5,1	3,11	0,32	1,65	0,28	0,23	0,14	6	36	34	7	4,13	98	97	96	99	94	91	96	16	93,82
ML-49	11,5	9,38	9,8	8,73	0,22	1,5	0,41	0,17	0,12	7	67	50	12	7,66	97	94	95	99	89	87	98	13	85,59
ML-50	10,8	9,8	9,8	6,98	0,04	0,96	0,1	0,07	0,02	5	49	43	10	8,8	99	96	95	99	87	86	99	4	88,41
ML-51	10,2	8,95	7,2	3,7	0,12	2,85	0,33	0,27	0,19	8	59	47	11	5,98	97	95	95	99	92	88	95	4	94,01
ML-52	14,3	8,2	13	10,6	0,1	1,21	0,66	0,32	0,25	7	51	40	10	6,89	97	95	94	99	89	87	95	8	69,89
ML-53	17,2	12,5	13,4	9,81	2,53	1,24	1,6	1,18	1,18	18	71	53	13	8,73	92	93	93	98	86	80	81	67	81,66
ML-54	4,3	2,6	2,7	1,3	0,08	1,5	0,5	0,31	0,31	8	44	37	8	1,02	97	96	95	99	98	96	95	5	96,91
ML-55	9,1	7,95	4,1	1,02	2,1	2,9	0,32	0,21	0,2	8	50	46	5	2,95	96	95	94	99	95	87	96	42	97,94
ML-56	8,4	6,1	5,7	4,2	0,8	1,9	0,51	0,13	0,09	7	37	33	2	3,4	95	97	96	100	93	88	97	30	85,76
ML-57	11,3	10,2	5,43	2,04	1,63	4,24	0,12	0,1	0,1	7	43	40	3	4,33	96	96	95	100	94	85	99	28	96,95
ML-58	7,6	5,6	4,32	0,75	0,43	2,85	0,12	0,19	0,17	7	30	30	3	2,316	96	97	95	99	95	88	88	13	97,81
ML-59	15,2	10,8	9,09	4,36	0,75	5,36	0,23	0,19	0,19	6	49	30	3	4,689	97	93	91	99	90	78	96	12	86,07

	NT	NTs	NKT	N-NH4	N-NO2	N-NO3	PT	PTs	P-PO4	SST	DQO	DQOs	DBO5	NKTs	rSST	rDQO	rDQOs	rDBO5	rNKTs	rNTs	rPTs	%N-NO2	rN-NH4
<b>ML-60</b>	16,5	13,6	8,02	3,66	0,8	7,68	0,12	0,08	0,07	7	40	30	5	5,12	97	96	96	99	90	73	99	9	88,74
<b>ML-61</b>	12,1	8,8	5,15	1,5	0,25	6,8	0,41	0,21	0,21	6	44	37	4	1,75	96	95	93	99	96	79	96	4	94,93
<b>ML-62</b>	12,2	9,5	7,28	3,01	0,12	4,8	1,67	1,44	1,27	6	54	41	8	4,58	96	94	94	99	93	86	72	2	94,67
<b>ML-63</b>	12,3	9,82	8,5	2,06	0,85	3	0,89	0,58	0,52	10	38	35	6	5,97	94	96	95	99	90	84	86	22	95,84
<b>ML-64</b>	15,1	13,2	6	1,09	0,62	8,48	1,28	1,07	0,86	12	42	40	6	4,097	93	96	94	99	91	71	77	7	97,34
<b>ML-65</b>	12,1	11,8	5,7	1,99	0,29	6,06	1,31	1,26	1,21	5	37	33	6	5,447	97	93	89	98	90	79	79	5	95,91
<b>ML-66</b>	9,9	8,85	4,3	0,16	0,25	5,4	0,38	0,29	0,19	7	47	32	8	3,202	97	96	96	99	94	84	96	4	99,66
<b>ML-67</b>	9,8	9,49	4,3	1,82	0,63	4,89	0,23	0,15	0,09	7	38	27	6	3,973	95	95	95	99	93	83	97	11	94,26
<b>ML-68</b>	12,1	11	2,9	0,52	0,35	8,84	0,37	0,25	0,09	8	43	25	7	1,806	97	96	97	99	96	76	95	4	98,56
<b>ML-69</b>	10,5	11,7	3,9	1,89	0,5	6,1	0,26	0,18	0,12	5	25	24	3	5,101	95	95	92	99	91	80	97	8	96,47
<b>ML-70</b>	10,2	11,5	1,8	1	0,52	7,89	0,29	0,2	0,14	7	27	25	13	3,093	97	97	96	98	95	80	96	6	97,79
<b>ML-71</b>	10,9	9,82	4,9	2,08	0,78	5,25	0,26	0,22	0,09	4	42	29	10	3,794	98	96	96	99	92	78	95	13	93,42
<b>ML-72</b>	10,1	11	5,3	4,66	0,87	3,9	0,29	0,29	0,22	5	27	26	8	6,232	96	97	95	98	89	81	95	18	87,57
<b>ML-73</b>	9,3	8,27	4,1	2,05	0,49	4,74	0,36	0,29	0,25	2	34	31	10	3,038	99	97	96	99	93	80	92	9	92,18
<b>ML-74</b>	7	6,8	2,6	0,39	0,61	3,79	1,33	1,15	1,13	8	34	29	11	2,4	94	96	96	98	95	84	73	14	98,59
<b>ML-75</b>	10,9	9,76	7,2	2,22	0,26	3,44	1,95	1,4	1,32	8	40	36	9	6,06	96	96	96	99	87	78	78	7	93,90
<b>ML-76</b>	8,8	6,8	5,4	1,53	0,79	2,64	2,5	2,25	2,07	10	52	36	10	3,37	92	94	94	99	92	85	64	23	95,84

## ANEXO 8. CALIDAD DEL EFLUENTE, RENDIMIENTOS DE ELIMINACIÓN, VARIABLES FÍSICOQUÍMICAS Y PARÁMETROS OPERACIONALES MEDIDOS EN LA EDAR CT, CX, DN Y QB

Tabla A. 20. Variables fisicoquímicas y parámetros operacionales medidos en la EDAR QB y CX

	QB 1	QB 2	QB 3	QB 4	QB 5	QB 6	QB 7	QB 8	QB 9	QB 10	QB 11	QB 12	QB 13	QB 14	QB 15	QB 16	QB 17	QB 18	QB 19	QB 20	QB 21	QB 22	QB 23	QB 24	QB 25
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	11,9	11,9	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	0,38	0,47	0,35	0,34	0,35	0,08	0,22	0,12	0,35	0,36	0,38	0,34	0,12	0,11	0,34	0,35
CMDDQOs	0,15	0,23	0,22	0,38	0,38	0,2	0,31	0,27	0,31	0,36	0,49	0,13	0,2	0,34	0,1	0,21	0,11	0,12	0,35	0,38	0,34	0,11	0,1	0,1	0,34
TRHr	15,9	15,9	15,0	16,0	17,1	15,4	16,4	16,8	16,0	16,3	13,6	17,2	15,9	17,7	18,2	13,5	16,6	17,6	16,6	18,7	18,0	18,2	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 <sub>r</sub>	16,0	16,0	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	16,4	18,0
OB	81	86	0	4	4	34	33	19	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	1630	1330	1511	2000
SSLM	2410	2035	2485	2290	2005	1830	1805	2370	2560	2470	1790	2940	2870	3320	2390	2965	2240	2430	2400	2650	2450	2660	2430	2950	3058
%SSVLM	82	83	81	78	79	80	81	79	82	81	79	82	82	87	83	77	80	78	75	78	78	74	77	68	77
R <sub>rec</sub>	18	2,1	2,0	2,2	2,0	2,1	2,0	1,7	1,6	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	118
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	153	138	149	142	125	142	131	135	143	143	134	128	134	149	143	133	145	139	126
%DQOs	45	62	52	42	45	47	53	53	58	57	75	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	1,6	1,9	1,5	1,6	1,9	1,9	2,1	1,9	1,9	1,9
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	0,55	0,00	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	0,38	0,33	0,34	0,17	0,35	0,24	0,24	0,26	0,17	0,22	0,20	0,22	0,23	0,34	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	34,4	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	188	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	4,95	3,08	3,52	4,28	6,34	5,94	3,99	10,2	1,31	1,98	1,82	1,25	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	2,5	2,2	6,1	1,8
CP-P04	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	11,5	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	3,1	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	16,4	18,4	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	4,5	29,1	38,7	0,0	0,0	5,5	0,0	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

	CXAB 1	CXAB 2	CXAB 3	CXAB 4	CXAB 5	CXAB 6	CXAB 7	CXAB 8	CXAB 9	CXAB 10	CXAB 11	CXAB 12	CXAB 13	CXAB 14	CXAB 15	CXAB 16	CXAB 17	CXAB 18	CXAB 19	CXAB 20	CXAB 21	CXAB 23
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	0,36	0,1	0,19	0,22	0,17	0,24	0,36
CMDDQOs	0,21	0,36	0,22	0,34	0,39	0,15	0,2	0,17	0,21	0,17	0,38	0,22	0,26	0,29	0,25	0,12	0,08	0,12	0,12	0,16	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 <sub>r</sub>	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	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
OA	99	98	100	100	91	100	48	100	98	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	1950	1794	946	1261	1720	1506	1580	1760	1699	1314	1676	1348	1012	1536	1477	1480	2540	1700
SSLM	1735	2020	1930	2350	1890	1630	1330	1100	1860	1560	1700	1550	1230	1125	2590	2980	2320	1870	2860	2750	2065	
%SSVLM	85	87	89	88	81	86	80	83	82	85	85	84	77	82	78	70	77	91	84	86	85	
R <sub>rec</sub>	13	14																				

Tabla A. 21. Variables fisicoquímicas y parámetros operacionales medidos en la EDAR DN

	DN1	DN2	DN3	DN4	DN5	DN6	DN7	DN8	DN9	DN10	DN11	DN12	DN13	DN14	DN15	DN16	DN17	DN18	DN19	DN20	DN21	DN22	DN23
EF	40	37	40	24	28	34	24	8,4	10	13	22	40	12	12	28	40	23	21	21	19	19	26	
CM	0,06	0,10	0,12	0,14	0,07	0,10	0,10	0,17	0,05	0,13	0,13	0,19	0,10	0,12	0,11	0,12	0,09	0,03	0,14	0,11	0,10	0,12	0,10
CMDQOs	0,08	0,08	0,09	0,09	0,10	0,07	0,09	0,07	0,05	0,10	0,09	0,11	0,13	0,13	0,12	0,11	0,16	0,03	0,08	0,09	0,08	0,12	0,13
TRHr	11,6	14,8	13,2	14,7	11,7	16,7	11,6	14,3	16,0	14,0	15,3	18,1	16,3	15,3	16,3	16,6	11,7	13,0	14,4	18,0	18,4	12,3	12,4
TRHds	5,1	6,6	5,9	6,6	5,2	7,4	5,2	6,4	7,1	6,3	6,8	8,1	7,3	6,8	6,9	7,1	5,2	5,8	6,4	8,0	8,2	5,5	5,5
Tr	16,8	14,6	10,8	15,6	15,4	16,1	17,2	15,9	15,7	19,1	20,3	21,7	22,9	23,2	25,5	24,6	24,4	21,1	22,7	18,8	18,2	19,2	11,6
OB	56	45	48	44	82	76	76	75	65	70	69	68	68	70	71	70	53	68	68	74	78	53	66
OM	44	55	51	56	18	24	22	25	31	27	30	31	32	28	27	28	45	30	32	26	22	23	31
OA	0	0	1	0	0	0	1	1	3	3	2	1	0	2	3	2	2	2	0	0	0	24	3
pHLM	7,35	7,42	7,56	7,12	7,50	7,10	6,92	7,25	7,55	7,59	7,13	7,23	7,46	7,65	7,22	7,73	7,03	7,52	8,00	7,31	7,39	7,55	7,69
CondLM	1848	2860	2840	2670	3920	2340	1050	2780	2330	3750	5440	3170	3060	3170	3390	2690	191	986	2520	3860	3670	1260	2660
SSLM	2950	3550	3340	2990	3330	3080	3360	2850	3670	2500	3030	3230	3510	3680	3200	3780	3360	3290	3210	3310	3190	3140	3030
%SSVLM	67	68	69	69	70	71	73	74	73	72	74,8	73	70	71	66	72	68	62	65	67	70	65	66
R.rec	3,5	15	15	13	14	13	2,0	1,3	1,8	2,0	1,5	1,3	1,6	0,7	1,4	1,4	2,1	3,1	1,5	1,7	1,4	2,9	2,4
IVF30	95	101	114	107	108	123	127	126	120	140	132	124	114	120	113	95	101	85	93	97	94	96	92
IVF5	176	180	187	187	204	234	241	211	240	224	238	223	205	196	188	164	166	156	157	163	163	166	165
NTLM	51	57	49	63	58	65	65	65	65	78	77	71	59	50	64	65	41	44	53	57	47	31	48
PTLM	40	36	32	36	32	38	38	34	33	38	29	31	29	34	35	28	34	38	37	36	38	43	38
DQLM	158	145	145	148	157	148	153	139	144	161	139	128	135	147	155	132	144	139	137	146	14	151	15
%DQOs	39	54	39	24	53	49	22	28	46	34	29	15	40	32	27	36	19	64	36	19	39	45	54
DQO/DBO	17	17	18	2,2	1,6	1,7	1,7	2,2	1,7	2,2	2,3	1,7	2,3	2,3	2,2	1,7	1,4	1,7	2,2	2,3	1,8	1,7	
CNT	313	30,1	418	32,1	412	37,0	43,9	416	18,6	39,9	27,6	28,9	43,5	37,6	54,7	34,9	416	23,3	57,8	62,0	27,8	43,3	33,9
CN-NH4	16,7	16,7	30,8	23,1	13,9	30,3	10,3	32,4	8,6	24,3	16,5	14,7	19,8	17,7	25,9	13,9	12,6	4,8	31,6	33,7	21,9	12,4	18,4
CPT	2,8	2,7	2,7	3,8	3,1	3,6	3,2	4,3	1,5	4,6	4,1	4,5	3,6	3,7	5,0	4,4	6,0	0,7	3,3	3,1	3,1	3,6	2,5
CP-PO4	17	16	16	2,3	1,9	2,1	2,3	4,0	1,0	4,0	2,5	2,8	2,4	3,0	3,4	2,2	4,4	0,6	1,3	1,9	1,6	1,5	2,0
C Carb	10,4	2,0	3,1	4,0	3,6	3,3	2,7	4,0	2,8	4,8	4,9	2,8	2,9	2,9	3,5	2,7	1,9	3,6	2,4	2,4	4,1	1,9	1,9
C Prote	15,7	20,1	15,7	20,6	17,7	14,4	11,6	27,9	7,9	40,1	35,4	27,0	24,2	30,5	33,5	30,2	19,5	3,6	23,8	20,5	32,7	1,8	19,3
CAG	12,5	10,7	16	7,9	12,4	7,2	9,0	11,2	17	11,5	16,0	12,9	12,7	12,1	11,9	5,3	8,7	0,9	6,4	9,0	12,3	1,9	1,9
CAGV	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0	0,0	7,1	8,2	16,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DBOS/NT	2,7	3,1	2,3	4,7	2,4	2,7	2,7	4,2	2,1	4,6	5,0	6,6	2,4	3,2	2,7	2,9	2,5	1,2	2,2	1,9	3,8	2,9	3,4
DBOS/PT	29,9	35,2	34,9	40,0	31,4	27,5	36,3	40,5	25,8	39,8	33,6	42,4	29,1	33,0	29,5	23,1	17,7	39,1	38,0	39,3	33,9	34,5	46,5

Tabla A. 22. Variables fisicoquímicas y parámetros operacionales medidos en la EDAR CT1

	CT11	CT12	CT13	CT14	CT15	CT16	CT17	CT18	CT19	CT110	CT111	CT112	CT113	CT114	CT115	CT116	CT117	CT118	CT119	CT120	CT121	CT122	CT123
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	5,3	5,6	5,3	5,3	5,3
Tr	17,0	17,0	17,0	18,0	19,0	19,0	19,0	20,0	23,0	24,0	25,0	26,0	28,0	29,0	27,0	24,0	26,0	24,0	26,0	24,0	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	41,6	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
R.rec	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	102	104	123	114	161	108	106	126	131	118	116	122	116	111	111
IVF5	157	160	145	146	183	179	156	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									

Tabla A. 23. Variables fisicoquímicas y parámetros operacionales medidos en la EDAR CT2

	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	31,0	17,0	10,0	11,0	5,0	9,0	6,0	6,0
CM	0,20	0,18	0,20	0,18	0,24	0,21	0,31	0,21	0,20	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	0,16	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	5,2	5,3	4,7
Ttr	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	18,0	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	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
pHLM	7,05	7,15	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	5180	4850	6350	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
R.rec	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	115	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	30	15	26	33	26	39	27	39	31	27	27
DQO/DBO	1,8	2,9	1,9	1,9	2,1	1,6	2,1	2,0	1,7	2,2	2,5	1,8	1,8	2,0	3,1	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	115,3	54,0	82,7	163,4	97,9	113,2	84,0
CN-NH4	191,6	51,3	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	143,9	65,9	109,5	41,3	42,4	85,0	153,2	86,6	104,9	47,7	11,3	116,3	104,6	102,7	99,2
CAG	37,9	49,7	51,4	16,0	30,7	39,0	21,8	27,5	37,0	34,5	31,1	20,6	20,2	24,5	24,0	14,1	37,7	17,6	20,7	30,5	29,9	37,7	32,1
CAGV	28,4	61,0	0,0	44,3	65,0	102,2	22,5	0,0	107,1	62,8	70,3	0,0	0,0	47,4	55,9	63,4	49,0	59,0	88,5	0,0	81,7	8,6	7,3
DBO5/NT	3,0	2,6	3,6	3,1	3,6	4,1	2,8	2,6	3,2	3,3	2,8	4,7	2,7	6,7	2,3	4,6	1,5	2,9	5,0	2,2	2,4	2,0	2,0
DBO5/PT	25,8	16,7	24,4	15,4	19,2	22,7	12,9	12,8	14,1	18,3	17,0	21,5	8,1	27,1	14,3	40,4	10,7	21,2	35,8	10,8	14,0	7,9	9,2

Tabla A. 24. Calidad del efluente y rendimientos de eliminación de contaminantes en la EDAR QB

	QB 1	QB 2	QB 3	QB 4	QB 5	QB 6	QB 7	QB 8	QB 9	QB 10	QB 11	QB 12	QB 13	QB 14	QB 15	QB 16	QB 17	QB 18	QB 19	QB 20	QB 21	QB 22	QB 23	QB 24	QB 25
Nt	36,5	46,5	41,0	32,5	24,5	29,0	26,0	48,0	46,0	50,0	28,5	16,0	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	11,8	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	18,3	0,3	2,4	1,2	4,1	0,9	2,3	10,6	18,6	0,1	0,1	0,6	11,6	1,5	1,5
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	2,70	5,26	5,67	3,16	0,82	145	155	0,85	128	0,22	0,61	0,39	100	121	0,12	0,34	0,04	2,02	0,34	0,32	0,22	0,40	15,0
N-NO3	11,1	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	21,2	41,5	35,3	4,8	23,6	10,9	2,7	6,3	5,1	10,9	1,5	2,0	11,6	22,0	1,5	1,6	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	1,1	1,7	12,8	19,6	1,5	1,0	1,5	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	11,8	29,0	41,2	50,3	29,6	17,0	22,1	14,4	8,3	26,2	4,3	16,0	8,6	11,9	23,7	1,1	4,2	10,0	30,5	6,7	5,7	2,7	5,3	16,1

Tabla A. 25. Calidad del efluente y rendimientos de eliminación de contaminantes en la EDAR CX

	CXAB 1	CXAB 2	CXAB 3	CXAB 4	CXAB 5	CXAB 6	CXAB 7	CXAB 8	CXAB 9	CXAB 10	CXAB 11	CXAB 12	CXAB 13	CXAB 14	CXAB 15	CXAB 16	CXAB 17	CXAB 18	CXAB 19	CXAB 20	CXAB 21	CXAB 22	CXAB 23
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</							



Tabla A. 26. Calidad del efluente y rendimientos de eliminación de contaminantes en la EDAR DN

	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	5,0	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	1,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	1,1	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	1,9	2,8	2,7	1,7	1,7	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	1,7	1,7	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	1,9	4,8	1,8	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	93	95	91	97	96	94	91	93
NKts	1,7	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	1,2	1,8	1,1	3,0	2,7	1,3	1,6	
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	1,5	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	

Tabla A. 27. Calidad del efluente y rendimientos de eliminación de contaminantes en la EDAR CT1

	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	26,0	45,0	53,0	49,0	48,0	54,0	52,0	36,0	39,0	41,0	31,0	27,0	24,0	25,0	20,0	32,0	22,0	27,0	29,0	37,0	37,0	30,0
rNt	46	28	32	36	26	32	38	35	51	44	34	48	53	47	46	57	44	52	47	50	38	33	42
Nts	30,0	25,0	45,0	53,0	48,0	46,0	48,0	51,0	35,0	38,0	40,0	30,0	25,0	23,0	23,0	19,0	26,0	17,0	21,0	28,0	36,0	26,0	29,0
rNts	42	29	25	30	4	21	20	35	45	30	27	41	49	36	44	54	43	60	52	38	33	48	42
N-NH4	24,0	24,0	42,0	43,0	44,0	45,0	40,0	48,0	34,0	37,0	24,0	28,0	26,0	17,0	12,0	25,0	4,4	34,0	20,0	30,0	20,0	28,0	28,0
rN-NH4	44	25	34	36	30	21	38	39	68	33	31	49	61	56	58	67	44	90	67	55	39	57	55
N-NO2	180	0,49	0,41	0,34	0,13	0,24	1,20	2,00	1,50	2,40	1,30	4,00	5,20	4,90	5,10	4,80	0,00	2,20	1,10	2,90	1,80	1,60	1,40
N-NO3	12	0,5	0,5	0,6	0,5	0,5	0,6	0,5	0,5	0,9	0,8	1,0	1,8	1,6	0,5	2,1	0,5	2,5	1,5	4,7	2,7	4,0	3,5
Nox	3,0	1,0	0,9	0,7	0,6	0,7	1,8	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	28,0	25,0	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	37	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

Tabla A. 28. Calidad del efluente y rendimientos de eliminación de contaminantes en la EDAR CT2

	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	32,0	27,0	40,0	39,0	46,0	44,0	52,0	49,0	35,0	37,0	41,0	28,0	32,0	25,0	23,0	25,0	35,0	22,0	28,0	29,0	35,0	31,0	29,0
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	30,0	25,0	36,0	36,0	45,0	44,0	44,0	48,0	34,0	36,0	32,0	26,0	31,0	24,0	22,0	24,0	32,0	20,0	26,0	28,0	34,0	30,0	28,0
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	23,0	20,0	30,0	33,0	36,0	42,0	41,0	39,0	21,0	34,0	28,0	23,0	29,0	21,0	15,0	19,0	31,0	16,0	23,0	21,0	29,0	26,0	17,0
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

## ANEXO 9. DATOS DE ATP, SSVATP Y CMATP

Tabla A. 29., Cálculo de la CM y los SSVLM en función del ATP y datos de ATP medidos en la EDAR ML

	tATP ng/mL	dATP ng/mL	cATP ng/mL	AVSS mg/L	BSI %	CM <sub>ATP</sub> Kg DBO5/ $\mu$ gcATP
ML-3	5783	260	5525	2763	5	1,35
ML-4	6303	394	5910	2955	6	1,30
ML-6	4990	191	4800	2400	4	1,15
ML-7	5340	344	5000	2500	6	1,38
ML-8	3480	265	3220	1610	8	0,86
ML-9	3030	291	2740	1370	10	0,68
ML-10	4920	665	4260	2130	14	1,10
ML-11	5000	1140	3860	1930	23	1,32
ML-12	3180	432	2750	1375	14	0,72
ML-13	3490	493	3000	1500	14	1,07
ML-14	6550	1710	4840	2420	26	2,84
ML-15	5450	930	4520	2260	17	1,17
ML-16	7300	793	6510	3255	11	1,49
ML-17	7230	650	6580	3290	9	1,90
ML-18	8210	780	7430	3715	10	1,63
ML-19	6440	482	5960	2980	7	1,40
ML-20	5420	776	4640	2320	14	1,11
ML-21	2690	227	2460	1230	8	0,57
ML-22	7560	760	6800	3400	10	1,60
ML-25	5390	2210	3180	1590	41	1,09
ML-28	5310	605	4710	2355	11	1,41
ML-29	4090	1060	3030	1515	26	0,74
ML-30	5620	868	4750	2375	15	1,21
ML-31	7370	725	6650	3325	10	1,74
ML-32	7000	1300	5700	2850	19	1,27
ML-33	7120	861	6260	3130	12	1,39
ML-35	6050	257	5790	2895	4	1,35
ML-36	6390	1320	5070	2535	21	1,33
ML-37	6270	216	6050	3025	3	1,52
ML-38	7550	1983	5567	2783	26	1,25
ML-39	8150	1290	6860	3430	16	1,71
ML-40	5930	409	5520	2760	7	1,27
ML-41	7980	437	7540	3770	5	1,72
ML-42	5230	646	4580	2290	12	1,57
ML-43	7140	1120	6020	3010	16	1,45
ML-44	8160	807	7350	3675	10	1,51
ML-45	8820	1010	7810	3905	11	1,63

---

	tATP	dATP	cATP	AVSS	BSI	CMATP
	ng/mL	ng/mL	ng/mL	mg/L	%	Kg DBO5/ $\mu$ gcATP
ML-46	9540	828	8710	4355	9	1,75
ML-47	7600	709	6890	3445	9	1,44
ML-48	7470	969	6500	3250	13	1,19
ML-49	7060	1000	6060	3030	14	1,04
ML-50	8760	692	8070	4035	8	1,38
ML-52	5740	1220	4520	2260	21	0,68
ML-53	7640	2200	5440	2720	29	1,34
ML-54	5150	1500	3650	1825	29	0,85
ML-55	7910	2450	5460	2730	31	1,47
ML-56	8840	1350	7490	3745	15	2,14
ML-57	9910	2740	7170	3585	28	1,59
ML-58	13400	1510	11900	5950	11	2,77

---

