



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Máster en Ingeniería
Hidráulica y Medio
Ambiente

Título del Trabajo Fin de Máster:

*Estudio de la población de bacterias
nitrificantes y su relación con los
parámetros físico-químicos, biológicos y
operacionales en una EDAR con sistema
convencional de Fangos Activos*

Intensificación:

TRATAMIENTO DE AGUAS

Autor:

AVENDAÑO VILAFRANCA, LIZ MARÍA

Director/es:

DR. AGUADO GARCÍA, DANIEL

DR. ALONSO MOLINA, JOSÉ LUIS

DR. BORRÁS FALOMIR, LUIS

Fecha: JULIO, 2011



Título del Trabajo Fin de Máster:

Estudio de la población de bacterias nitrificantes y su relación con los parámetros físico-químicos, biológicos y operacionales en una EDAR con sistema convencional de Fangos Activos

Autor: **AVENDAÑO VILAFRANCA, LIZ MARÍA**

Tipo	A <input type="checkbox"/> B <input checked="" type="checkbox"/>	Lugar de Realización	VALENCIA
Director	DANIEL AGUADO GARCÍA	Fecha de Lectura	JULIO, 2011
Codirector1	JOSÉ LUIS ALONSO MOLINA		
Codirector2	LUIS BORRÁS FALOMIR		
Tutor	DANIEL AGUADO GARCÍA		

Resumen:

La presencia de compuestos nitrogenados en el efluente de los procesos de fangos activos puede perjudicar la calidad de las aguas receptoras. Los principales compuestos nitrogenados presentes en el agua efluente de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) son el amonio (NH₄⁺), los nitritos (NO₂⁻) y los nitratos (NO₃⁻). Entre los efectos negativos, consecuencia del vertido de estos compuestos al medio acuático receptor, podemos destacar el agotamiento de oxígeno disuelto (OD), la toxicidad y la eutrofización.

La eliminación biológica de nitrógeno se realiza mediante la combinación de los procesos de nitrificación y desnitrificación. La nitrificación depende de la presencia de poblaciones de bacterias nitrificantes encargadas de realizar dicha transformación.

En este trabajo se ha identificado y cuantificado la población de bacterias nitrificantes presentes en el licor mezcla de la EDAR de Quart Benager (Valencia) a lo largo de un año, incluyéndose el análisis de su evolución temporal así como la determinación de posibles relaciones entre las variables operacionales, físico-químicas y la presencia de protistas en el fango activo. De esta forma se podrán conocer los factores físico-químicos y operacionales que afectan especialmente a las distintas poblaciones nitrificantes, favoreciendo o inhibiendo ciertas especies, así como también determinar bioindicadores de este proceso en el sistema.

La determinación de la población de bacterias nitrificantes se llevó a cabo mediante la técnica molecular de hibridación in situ con sondas marcadas con fluorocromos (FISH). La cuantificación de las bacterias amonio-oxidantes (AOB) se ha realizado con las sondas: Nso1225, Nmo218, NEU y Nse1472 y de las bacterias nitrito-oxidantes con las sondas: Ntspa662 y NIT3.

Las sondas que dieron señal positiva, correspondientes a las bacterias AOB, fueron del género Nitrosomonas, siendo el principal subgénero de las AOB las N.oligotropha; también se observó una menor presencia de bacterias del género Nitrosococcus mobilis. Por otra parte el género dominante de bacterias NOB fue Nitrospira.

Al realizar el análisis estadístico se observaron correlaciones importantes entre algunos de los parámetros físico-químicos y la cantidad de bacterias nitrificantes. Estos parámetros físico-químicos corresponden principalmente a la demanda química de oxígeno (DQO) del afluente y a los compuestos nitrogenados del afluente y del efluente. Con respecto a los parámetros operacionales se obtuvieron correlaciones positivas para la edad de fango (EF) y las bacterias nitrificantes y correlaciones negativas para la carga másica con respecto a las mismas.

Con respecto a los protistas presentes, pudo observarse que los ciliados reptantes podrían



desempeñar una función bioindicadora importante del proceso de nitrificación, debido a que su presencia aumenta cuando se incrementa la cantidad de bacterias nitrificantes en el licor mezcla.

Summary:

The presence of nitrogen compounds in the effluent of activated sludge processes may harm the quality of surface water systems. The principal nitrogen compounds which can be found in the effluent of sewage treatment plants are ammonium (NH₄⁺), nitrites (NO₂⁻) y nitrates (NO₃⁻). The dumping of these components to the environment may have negative impacts on aquatic systems like depletion of dissolved oxygen, toxicity and eutrophication.

The biological elimination of nitrogen is realized applying the processes of nitrification and denitrification. The nitrification process depends on the presence of nitrifying bacteria populations.

This work was made in order to indentify and quantify the population of nitrifying bacteria in the effluent of the sewage treatment plant Quart Benager (Valencia) in the observation period of one year. The main objectives were the analysis of the temporal evolution of the bacteria population as well as the determination of possible relations between operational parameters, physical and chemical parameters and the presence of protozoa. This investigation helps to identify the most important physical-chemical and operational factors and their effect on the different nitrifying bacteria populations, accelerating or inhibiting the growth of certain species, as well as the determination of bioindicators in the nitrification process.

The determination of the nitrifying bacteria populations was realized applying the molecular technique FISH (Fluorescent in situ hybridization). Ammonium oxidizing bacteria (AOB) were indentified using the probes Nso1225, Nmo218, NEU y Nse1472, nitrite oxidizers (NOB) with the probes Ntspa662 y NIT3.

The AOB's detected and quantified in the effluent were members of the genus Nitrosomonas, with N. oligotropha as the principal subgenus. Furthermore a minor presence of the genus Nitrosococcus mobilis was observed. On the other hand the predominating genus of NOB was the Nitrospira.

Applying statistical analysis, important correlations between physical-chemical parameters and the quantity of nitrifying bacteria were found. The chemical oxygen demand (COD) of the tributary water as well as nitrogen compounds in the tributary and effluent water turned out to be the most important physical-chemical parameters. Considering the operational parameters, positive correlations between the age of the sludge and nitrifying bacteria and negative correlations between mass load and bacterial growth were observed.

The observation of protozoa indicates that crawling ciliates could have an important function as bioindicators in the nitrification process, because the presence of this protozoa increased with increasing amount of nitrifying bacteria

Resum:

La presència de compostos nitrogenats en l'efluent dels processos de fangs actius pot perjudicar la qualitat de les aigües receptors. Els principals compostos nitrogenats presents en l'aigua efluent de les Estacions Depuradores d'Aigües Residuals (EDAR) són l'amoni (NH₄⁺), els nitrits (NO₂⁻) i els nitrats (NO₃⁻). Entre els efectes negatius, conseqüència de l'abocament d'estos compostos al medi aquàtic receptor, podem destacar l'esgotament d'oxigen dissolt (OD), la toxicitat i l'eutrofització.

L'eliminació biològica de nitrogen es realitza per mitjà de la combinació dels processos de nitrificació i desnitrificació. La nitrificació depèn de la presència de poblacions de bacteris nitrificants encarregades de realitzar la dita transformació.

En aquest treball s'ha identificat i quantificat la població de bacteris nitrificants presents en el licor mescla de l'EDAR de Quart Benager (València) al llarg d'un any, incloent-se l'anàlisi de la seua evolució temporal així com la determinació de possibles relacions entre les variables operacionals, fisicoquímiques i la presència de protistes en el fang actiu. D'esta manera es podrán conèixer els



factors fisicoquímics i operacionals que afecten especialment les distintes poblacions nitrificants, afavorint o inhibint certes espècies, així com també determinar bioindicadors d'aquest procés en el sistema.

La determinació de la població de bacteris nitrificants es va dur a terme per mitjà de la tècnica molecular d'hibridació in situ amb sondes marcades amb fluorocroms (FISH). La quantificació dels bacteris amoni-oxidants (AOB) s'ha realitzat amb les sondes: Nso1225, Nmo218, NEU i Nse1472 i dels bacteris nitrit-oxidants amb les sondes: Ntspa662 i NIT3.

*Les sondes que van donar senyal positiu, corresponents als bacteris AOB, van ser del gènere Nitrosomònades, sent el principal subgènere de les AOB les *N. oligotropha*; també es va observar una menor presència de bacteris del gènere *Nitrosococcus mobilis*. D'altra banda el gènere dominant de bacteris NOB va ser *Nitrospira*.*

Al realitzar l'anàlisi estadística es van observar correlacions importants entre alguns dels paràmetres fisicoquímics i la quantitat de bacteris nitrificants. Aquests paràmetres fisicoquímics corresponen principalment a la Demanda Química d'Oxigen (DQO) de l'afluent i als compostos nitrogenats de l'afluent i de l'efluent. Respecte als paràmetres operacionals es van obtenir correlacions positives per a l'Edat de Fang (EF) i els bacteris nitrificants i correlacions negatives per a la Càrrega Màsica respecte a les mateixes.

Respecte als protistes presents, es va poder observar que els ciliats reptants podrien exercir una funció bioindicadora important del procés de nitrificació, pel fet que la seua presència augmenta quan s'incrementa la quantitat de bacteris nitrificants en el licor mescla.

Palabras clave:

NITRIFICACIÓN, AOB, NOB, PROTOZOOS Y FISH

Agradecimientos

Le agradezco a mis padres por permitirme tener esta oportunidad de realizar este master, de aprender y de conocer este país que tanto me ha dado.

A mis hermanas por ser un apoyo, orientarme y darme alegría en muchos momentos de mi vida en estos años.

A mis tutores, José Luis, Luis y Daniel por su paciencia y dedicación. José Luis gracias por prestarme un espacio en el laboratorio, enseñarme día a día y orientarme en muchos aspectos.

A la EPSAR por facilitar los datos para la elaboración de este proyecto y a Andrés Zornoza por su orientación en muchos aspectos importantes del proyecto.

A la gente del laboratorio, en especial a Inmaculada Amorós y a Mariela Reyes por las buenas energías que emanan, por escucharme y por hacer del laboratorio un sitio tan ameno.

A Max Reisinger por darme luz, enseñarme mucho de la vida y por su excelente compañía.

A mis amigos que siempre han estado conmigo a pesar de las distancias.

INDICE

1. Introducción	1
1.1 Tratamientos Biológicos de Aguas Residuales	2
1.2 Principales Organismos que intervienen en los Sistemas de Tratamiento Biológico.....	2
1.2.1 Bacterias Nitrificantes.	2
1.2.2 Protozoos como bioindicadores en los fangos activos.	5
1.3 Nitrificación.....	9
1.3.1 Ciclo del Nitrógeno.	10
1.3.2 Factores que afectan a la nitrificación.....	12
1.4 Técnicas Moleculares para la determinación de las poblaciones microbianas.....	18
1.4.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	19
1.4.2 Hibridación <i>in situ</i> con sondas marcadas con fluorocromos (FISH).	19
2. Objetivos	27
3. Materiales y Métodos.....	28
3.1 Toma de muestras.....	28
3.1.1 Parámetros físico-químicos y biológicos	30
3.1.2 Identificación y recuento de protozoos	31
3.1.3 Variables Operacionales.....	31
3.2 Hibridación Fluorescente <i>in situ</i> "FISH"	32
3.2.1 Fijación de las muestras.	32
3.2.2 Tratamiento de los portaobjetos cubiertos con Teflón.	33
3.2.3 Aplicación de las muestras a los portaobjetos FISH.	33
3.2.4 Hibridación <i>in situ</i>	34
3.2.5 Sondas utilizadas.	35

3.3	Cuantificación de Microorganismos.....	37
3.4	Análisis Estadístico.....	39
3.4.1	Coeficiente de correlación lineal de Pearson.	41
3.4.2	Coeficiente de Correlación de Spearman	42
3.4.3	Análisis de Componentes Principales (ACP).....	43
3.4.4	Tratamiento por ordenador.....	44
4.	Resultados.....	49
4.1	Toma de imágenes con señal de hibridación.	49
4.2	Cuantificación de la señal de hibridación mediante el análisis de imagen.....	52
4.2.1	Análisis Cuantitativo	53
4.3	Análisis Estadístico entre las señales obtenidas para las bacterias AOB y NOB y los parámetros operacionales de la EDAR.....	57
4.3.1	Resumen Estadístico de las variables físico-químicas, operacionales y protistas....	57
4.3.1	Coeficientes de Pearson y Spearman. Análisis Bivariante.....	60
4.3.2	Análisis de Componentes Principales (ACP).....	65
4.4	Análisis cualitativo de gráficos entre las señales obtenidas de bacterias AOB y NOB y los parámetros de la EDAR.	71
4.4.1	Comparación entre la población de AOB (<i>Nitrosomonas</i> y <i>N. oligotropha</i>) y las NOB (<i>Nitrospira</i>).....	72
4.4.2	Análisis cualitativo de los parámetros físico-químicos	74
4.4.3	Análisis cualitativo de variables operacionales.....	76
4.4.4	Análisis cualitativo de protozoos presentes en licor mezcla	77
5.	Discusión.....	79
6.	Conclusiones.....	86
7.	Recomendaciones	88
8.	Referencias.....	xii

INDICE FIGURAS

Figura 1. Imágenes de distintos Flagelados (fotos: Andrés Zornoza).....	6
Figura 2. Imágenes de los distintos grupos de Ciliados (Fotos: Andrés Zornoza).....	7
Figura 3. Imágenes de Amebas Testáceas y de Amebas Desnudas Grandes (Fotos: Andrés Zornoza).	8
Figura 4 Ciclo del Nitrógeno en Aguas Residuales (Gerardi, 2002).	11
Figura 5. Hibridación in situ (FISH).	20
Figura 6. Árbol filogenético del gen 16S rARN basado en los linajes principales de bacterias amonio-oxidantes conocidas (Daims t al, 2009).	21
Figura 7. Árbol filogenético del genero <i>Nitrosomonas</i> inferido del análisis comparativo del gen 16S rDNA (Gieseke <i>et al</i> , 2000).	22
Figura 8. Árbol filogenético que muestra las relaciones de las AOB aisladas <i>N. mobilis</i> Nm93 y <i>N. europaea</i> Nm103 y otras bacterias cercanas pertenecientes a la subclase <i>Proteobacteria</i> . (Juretschko <i>et al</i> , 1998).	23
Figura 9. Árbol filogenético del gen 16S ARNr basado en los linajes principales de bacterias nitrito-oxidantes conocidas (Daims <i>et al</i> , 2009).	23
Figura 10. Diagrama de Bloques de la EDAR de Quart Benager (EPSAR).	29
Figura 11 . Esquema campaña de muestreo	29
Figura 12. Pasos de la Técnica FISH (Zornoza, 2010a).....	33
Figura13. Esquema de las sondas utilizadas en el presente estudio para las AOB y NOB.....	37
Figura 14 Flujo de procesos para la cuantificación de bacterias.....	39
Figura 15. Esquema de la matriz a analizar.	40
Figura 16. Representación esquemática de las matrices del modelo ACP.....	44
Figura 17. A) AOB sonda Nso 1225, B) Mismo campo sondas EUB338mix, 60x. Muestra 4.	50
Figura 18. A) AOB, <i>N. oligotropha</i> . sonda Nmo 218, B) Mismo campo, EUB338mix, 60x. Muestra 4.....	50
Figura 19. A) AOB, sonda NEU, B) Mismo campo, EUB338mix, 60x. Muestra 4.....	51

Figura 20. A) NOB, <i>Nitrospira</i> spp. sonda Ntspa 662, B) Mismo campo, EUB338mix, 60x. Muestra 4.....	51
Figura 21. Hoja de cálculo generada por el programa de cuantificación de señal.....	52
Figura 22. Saturaciones por componentes para las variables Físico-Químicas.	67
Figura 23. Puntos de objetos según el número de muestra para las variables Físico Químicas	68
Figura 24. Diagrama de dispersión biespacial de las variables Operacionales.....	69
Figura 25. Diagrama de dispersión biespacial de los protistas	70
Figura 26. Abundancia en porcentaje de Nitrosomonas (Nso1225), <i>N. oligotropha</i> (Nmo218) y <i>Nitrospira</i> (Ntspa662) en el licor mezcla de la EDAR de Quart Benáger.....	73
Figura 27. Comparación de la cantidad de AOB del género <i>Nitrosomonas</i> (Nso1225) con el Rendimiento de eliminación de $N-NH_4^+$	74
Figura 28. Comparación entre el Caudal afluente de DQO total y las sondas generales estudiadas.	75
Figura 29. Comparación entre el Nitrógeno soluble y el $N-NH_4$ en efluente y las sondas generales estudiadas.	75
Figura 30. Comparación entre la Carga Másica (CM) y las sondas generales estudiadas (Nso 1225 y Ntspa662).	76
Figura 31. Comparación entre la edad de fango (EF) y las sondas generales estudiadas (Nso 1225 y Ntspa662).	77
Figura 32. Comparación entre la población Total de Reptantes en el LM y las poblaciones de AOB estudiadas (Nso 1225 y Nmo 218).....	78

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Temperatura y nitrificación (Gerardi, 2002).....	12
Tabla 2. Temperatura y TRC requerido para la nitrificación (Gerardi, 2002).....	13
Tabla 3. Influencia del pH en el proceso de nitrificación (Gerardi, 2002)	14
Tabla 4. Concentración de OD y grado de nitrificación alcanzada (Gerardi, 2002).....	15
Tabla 5. Concentraciones inhibitoras de algunos residuos Inorgánicos y Orgánicos (Gerardi, 2002).....	17
Tabla 6. Condiciones Óptimas de Nitrificación (Adaptación del U.S EPA, 1977).	18
Tabla 7. Parámetros Físico-químicos y biológicos del afluente, efluente y licor mezcla.	30
Tabla 8. Parámetros Operacionales (Zornoza <i>Et al</i> , 2010b).	31
Tabla 9. Preparación de la solución de hibridación según el porcentaje de formamida requerido.	34
Tabla 10. Preparación de la solución de lavado.	35
Tabla 11. Sondas utilizadas en este estudio.	36
Tabla 12. Números de muestras con sus fechas de muestreo correspondientes.	40
Tabla 13. Nomenclatura utilizada en el ACP para las variables físico-químicas.	46
Tabla 14. Nomenclatura utilizada en el ACP para las variables operacionales.	47
Tabla15. Nomenclatura utilizada en el ACP para las variables biológicas (protistas).	47
Tabla 16. Promedio de las áreas en pixeles ocupadas por las <i>Nitrosomonas</i> (Nso1225) y las <i>N.oligotropha</i> (Nmo218) con su error respectivo.	53
Tabla 17. Promedio de las áreas en pixeles ocupadas por las bacterias <i>Nitrospira</i> spp y su error respectivo.	54
Tabla 18. Observaciones de las comunidades bacterianas hibridadas por la sonda NEU.	56
Tabla 19. Resumen Estadístico de las variables físico-químicas.	57
Tabla 20. Resumen Estadístico de las variables operacionales.....	59
Tabla 21. Resumen Estadístico de los protozoos.	59

Tabla 22. Correlaciones de Pearson y Spearman entre las AOB (<i>Nitrosomonas</i> y <i>N.oligotropha</i>) y la NOB (<i>Nitrospira</i>) con las variables físico-químicas del proceso.....	60
Tabla 23. Correlaciones de Pearson y Spearman entre las AOB (<i>Nitrosomonas</i> y <i>N.oligotropha</i>) y la NOB (<i>Nitrospira</i>) con las variables operacionales del proceso.	63
Tabla 24. Correlaciones de Pearson y Spearman entre las AOB (<i>Nitrosomonas</i> y <i>N.oligotropha</i>) y la NOB (<i>Nitrospira</i>) con los grupos de protozoos presentes en el licor mezcla.	64
Tabla 25. Correlaciones de Pearson y Spearman entre las AOB (<i>Nitrosomonas</i> y <i>N.oligotropha</i>) y la NOB (<i>Nitrospira</i>) y con estas bacterias con respecto al Redimiento del proceso de nitrificación.	65

1. Introducción

El objetivo primordial de la depuración de las aguas es la adecuación de las aguas residuales, bien sea industriales o domésticas, a la calidad del medio receptor, para evitar daños irreversibles en las mismas (Catalán, 1997).

Las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) son las encargadas de depurar las aguas para que cumplan con la legislación y los límites de vertido establecidos para el cauce de agua receptor. Generalmente las EDAR están compuestas por un tratamiento primario (eliminación de sólidos), secundario (biológicos) y terciario (desinfección) (Catalán, 1997).

En el tratamiento biológico se encuentra una gran variedad de microorganismos que permiten la degradación de materia orgánica consumiendo oxígeno y que también eliminan nutrientes. Las comunidades bacterianas dentro de estos reactores biológicos son diversas, complejas y dinámicas e influyen en el funcionamiento y el rendimiento del mismo (Wells *et al.*, 2009).

Uno de los procesos biológicos que ocurre es la nitrificación, la cual es muy importante debido a que protege a las aguas, donde se realizan los vertidos, de una fuerte demanda de oxígeno y de la toxicidad del amoníaco. Las bacterias amonio oxidantes (AOB) y nitrito-oxidantes (NOB) son claves para la eliminación del nitrógeno en los biorreactores de fangos activos. Generalmente a este proceso le sigue la desnitrificación, donde el nitrógeno se elimina de la fase acuosa y el potencial de eutrofización disminuye.

El linaje de las AOB en los biorreactores es dinámico pero los factores operacionales o ambientales subyacentes no están claros (Wells *et al.*, 2009), por eso en este estudio se pretende estudiar la evolución poblacional de las AOB y NOB a lo largo del tiempo y las relaciones entre los cambios en la dinámica poblacional y los factores operacionales, físico-químicos y biológicos en una EDAR.

1.1. Tratamientos Biológicos de Aguas Residuales

Los tratamientos biológicos tienen como objetivos la eliminación de materia orgánica de las aguas residuales, así como la oxidación del nitrógeno amoniacal (nitrificación), la eliminación del nitrógeno a través de la conversión de las formas oxidadas a nitrógeno gaseoso (desnitrificación) y/o la eliminación de fósforo (Ferrer, 2007).

Los tratamientos biológicos se pueden clasificar en:

- Procesos biológicos de cultivo en suspensión donde se destacan los fangos activos.
- Procesos biológicos de soporte sólido.

Los fangos activos existen en un extenso número de variaciones y modificaciones. En la última década han tenido un importante desarrollo en el tratamiento de aguas residuales e industriales, en la eliminación de nitrógeno y fósforo y en las tecnologías de control del *bulking* filamentoso (Wesley *et al*, 1992).

1.2. Principales Organismos que intervienen en los Sistemas de Tratamiento Biológico.

Los microorganismos más importantes en los fangos activos son las bacterias. Los hongos, protozoos y metazoos tienen un papel secundario (Wesley *et al*, 1992). A continuación se describen cada uno de estos grupos.

1.2.1 Bacterias Nitrificantes.

La estructura celular procariota de las bacterias es significativamente diferente de las formas superiores tales como las algas unicelulares, protozoos, invertebrados, plantas y animales (Gerardi, 2002).

Únicamente las *Archaea* tienen una estructura celular similar tan simple. Las bacterias son los organismos vivos más numerosos de la tierra en términos de número de especies, número de organismos y masa total de los mismos. Cada célula tiene un tamaño entre 1-2 μm de diámetro y de largo.

Las bacterias crecen en forma individual, pares, grupos de cuatro (tétradas), cubos (sarcina), grupos irregulares o cadenas. Las células bacterianas individuales puede ser esféricas (cocos), en forma de bastón (bacilos), o helicoidales (espirilos). La técnica de tinción de Gram, se utiliza para diferenciar las bacterias Gram positivas de las bacterias Gram negativas, y es una de las técnicas convencionales junto con la tinción de Neisser que sirven para diferenciar diferentes morfotipos de bacterias filamentosas. Las bacterias nitrificantes son Gram negativas.

Las bacterias nitrificantes viven en una gran variedad de hábitats, incluyendo agua dulce, agua potable, aguas residuales, agua de mar, agua salobre y en el suelo. Los principales géneros de bacterias nitrificantes en los fangos activos usan dióxido de carbono o carbono inorgánico para la síntesis de material celular. Por cada molécula de dióxido de carbono asimilado, aproximadamente 30 moléculas del ion amonio o 100 moléculas de nitrito deben ser oxidadas. Debido a la gran cantidad de iones amonio y nitrito que son necesarios para asimilar dióxido de carbono, las bacterias nitrificantes tienen una muy baja velocidad de crecimiento (Gerardi, 2002).

El término nitrificación, como se explicó anteriormente en este capítulo, se refiere a la oxidación secuencial aeróbica del amonio a nitrito y luego a nitrato. Estos dos pasos son catalizados por organismos procariotas quimilitótrofos denominados: bacterias amonio oxidantes (AOB), *Archaea* amonio oxidantes (AOA) y bacterias nitrito oxidantes (NOB). Hasta el momento no existen organismos capaces de realizar ambos pasos por sí mismos (Daims *et al*, 2009).

Todas las bacterias presentan diversas características. A continuación se presenta una breve descripción de cada una de ellas:

- Bacterias Amonio Oxidantes (AOB)

Filogenéticamente las AOB se limitan a dos clases diferentes dentro del phylum *Proteobacteria*: *Gammaproteobacterias* y *Betaproteobacterias*. La mayoría son *Betaproteobacterias*, incluyendo *Nitrosomonas* y *Nitrospira*. Todos los miembros del género *Nitrospira* están muy relacionados, en cambio en el grupo de las *Nitrosomonas*, hay seis linajes distintos de descendencia (Purkhold *et al*, 2003; Mota *et al*, 2005). Las únicas especies nitrificantes conocidas dentro de las *Gammaproteobacteria* son *Nitrosococcus oceani* y *Nitrosococcus halophilus* que hasta el momento solo se han observado en ambientes marinos (Kowalchuk *et al*, 2001).

En la mayoría de las EDAR, el amonio es oxidado por las AOB del género *Nitrosomonas*. Comúnmente las AOB están relacionadas con *N. europaea*, *N. eutropha*, *N. mobilis* y *N. oligotropha*. Diferencias locales en las concentraciones de sustrato dentro del flóculo o de la biocapa pueden afectar a la distribución y la actividad de las AOB en las EDAR (Daims *et al*, 2009).

En los fangos activos, en los flóculos y en la biocapa, las AOB referidas a las *Nitrosomonas* generalmente forman agregados celulares esféricos y compactos. Las células individuales dentro de estos grupos son visibles a 600 o 1000 aumentos. El diámetro de la mayoría de las agrupaciones de AOB es de 10 a 50 μm . Ocasionalmente se producen grupos más pequeños, en los que las células están presentes de forma irregular con más espacios entre las mismas. Las células individuales de AOB son rara vez encontradas en fangos activos por microscopía, así que suelen ser pasadas por alto cuando se observan flóculos densos a través del microscopio (Daims *et al*, 2009).

Las AOB del género *Nitrospira* se han detectado ocasionalmente en las EDAR, pero éstas se encuentran comúnmente en hábitats terrestres y juegan un papel de menor importancia para el tratamiento de aguas residuales (Daims *et al*, 2009).

Respecto a la distribución de las AOB en el flóculo, estudios realizados por Matsumoto *et al*. (2010) donde evaluaron la estructura de los gránulos con un diámetro medio de 1600 μm producidos en un reactor aerobio alimentado con amonio, revelaron que las AOB dominaron los primeros 200 μm por debajo de la superficie del gránulo.

- Bacterias Nitrito Oxidantes (NOB)

Las NOB forman cuatro grupos filogenéticos distintos: *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina* y *Nitrospira* (Mota *et al*, 2005). En la mayoría de las EDAR las bacterias nitrito oxidantes dominantes pertenecen al género *Nitrospira* o *Nitrobacter* (Wagner *et al*, 1996; Mota *et al*, 2005). Las *Nitrospira* son de crecimiento lento, muy difíciles de cultivar en el laboratorio; es un género diverso que se compone de varios sublinajes filogenéticos (Daims *et al*, 2009).

En las aguas residuales las bacterias *Nitrospira* forman agregados esféricos o irregulares, que contienen cientos o miles de células. Los diámetros de estos agregados va desde 10-100 μm , aunque es posible conseguir grupos mayores en algunas ocasiones (Daims *et al.*, 2009).

Matsumoto *et al.* (2010) observaron, que en la estructura de los gránulos con un diámetro medio de 1600 μm producidos en un reactor aerobio alimentados con amonio, las NOB se encuentran a unos 200 a 300 μm de profundidad, es decir a mayor profundidad que las AOB.

El género *Nitrobacter* parece desempeñar un papel menor en las EDAR con concentraciones de nitrito medias. Sin embargo, hay presencia de *Nitrobacter* en reactores que contienen elevadas concentraciones de nitritos, como por ejemplo reactores Batch tratando altas concentraciones de fangos (Daims *et al.*, 2001). Esto puede deberse a que las *Nitrobacter* prosperan en aguas con altas concentraciones de oxígeno y de nitritos, al contrario de las *Nitrospira* que se adaptan mejor a bajas concentraciones de nitrito y de oxígeno disuelto (Schramm *et al.*, 1999).

Todas las gamma-AOB aisladas y los miembros de los géneros *Nitrococcus* y *Nitrospina* son halófilos y por lo tanto no se espera una presencia significativa en las EDAR (Koops *et al.*, 2001).

1.2.2 Protozoos como bioindicadores en los fangos activos.

Entre los protozoos se encuentra una larga colección de organismos con una gran diversidad morfológica y fisiológica. Son organismos eucariotas y unicelulares. La mayoría son heterótrofos y son encontrados en casi todos los ambientes acuáticos, estando ampliamente distribuidos (Horan, 2003).

Los protozoos constituyen un 5% aproximadamente de la biomasa en los fangos activos, donde se han encontrado unas 200 especies. Estos organismos son necesarios debido a que eliminan coliformes y patógenos, clarifican el efluente y contribuyen a la floculación de la biomasa (Ferrer, 2007). Los protozoos se clasifican en tres clases de nadadores libres (flagelados, ciliados y sarcódinos) y una que comprende los protozoos parásitos (Horan, 2003).

- Flagelados: *Mastigophora*.

Este grupo de protozoos siempre tienen flagelos como orgánulos de locomoción. A diferencia de los ciliados, los cuales tienen división celular transversal, los flagelados tienen división celular longitudinal (Stainer *et al*, 1996).

El grupo *Mastigophora* es uno de los más diversos grupos de protozoos y probablemente también el grupo más antiguo de estos organismos. Los microbiólogos incluyen en este grupo a las algas que son miembros de la *Euglenophyta*. El esquema de clasificación del grupo *Mastigophora* se subdivide en dos grupos, el *Zoomastigophora* que incluye a los organismos aceptados como exclusivamente protozoarios y el *Phytomastiphora* que incluye los organismos de *Euglenophyta* (Sterritt *et al*, 1988).

Entre sus características principales se encuentra que tienen uno, dos o numerosos flagelos, pueden o no tener invaginación apical o sitio de inserción de los flagelos. Poseen un núcleo, estriación u ornamentación superficial. Los gránulos de reserva son: paramilo, almidón, crisolaminarina, entre otros y pueden tener presencia o ausencia de plastos (autótrofos vs. heterótrofos) (Zornoza, 2010a). En la Figura 1 se presentan imágenes del grupo de protistas flagelados.

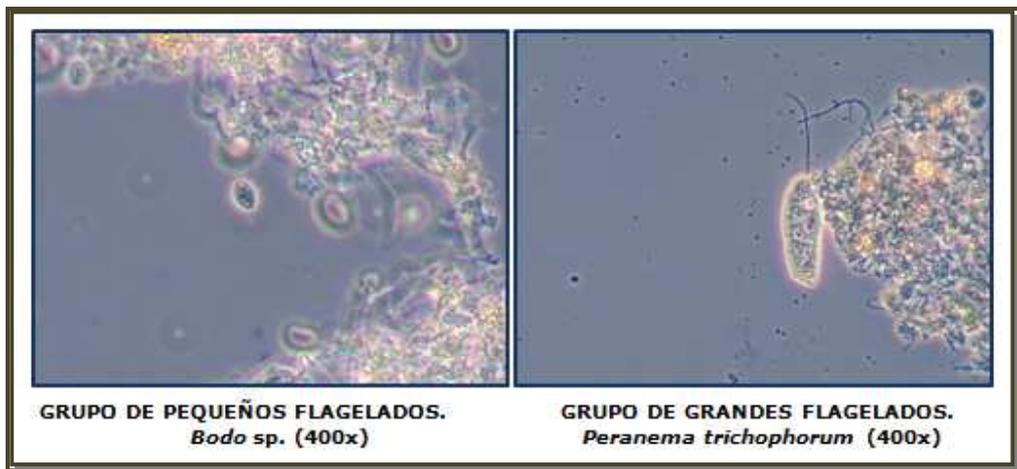


Figura 1. Imágenes de distintos Flagelados (fotos: Andrés Zornoza)

- Ciliados: *Ciliophora*.

Los ciliados tienen el más alto grado en la diferenciación subcelular de los protozoos. Poseen un cilio que es responsable del rápido movimiento de estos organismos en el agua. También poseen cilios orales los cuales son responsables de la nutrición. La mayoría de los ciliados tienen vida libre y son selectivos en su alimentación, limitándose a microbios de un género o especie (Sterritt *et al*, 1988).

Los cilios somáticos distribuidos en hileras se denominan cinetias (cirros). Con respecto a la ciliación oral, si es poco diferenciada se denomina circumoral, y cuando es altamente especializada se llama membrana paroral, membranelas, penículos, entre otros. Los microorganismos ciliados tienen dualismo nuclear: macronúcleo/s y micronúcleos (Zornoza, 2010).

En la Figura 2 se presentan imágenes de los distintos grupos de ciliados, correspondientes a los ciliados reptantes, nadadores y sésiles.

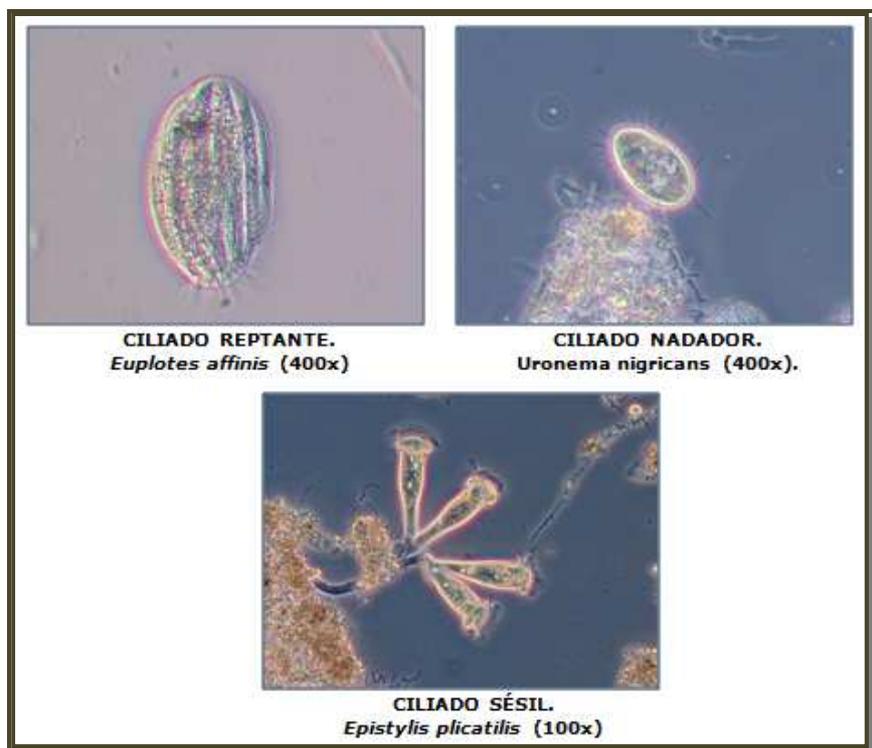


Figura 2. Imágenes de los distintos grupos de Ciliados (Fotos: Andrés Zornoza).

- Amebas: *Sarcodina*.

El grupo de las amebas son protozoos en los que la locomoción *ameboide* es la forma predominante de movimiento celular, aunque también algunos de ellos son capaces de producir flagelos. Los miembros más sencillos de este grupo de protozoos son las amebas, que tienen células característicamente amorfas a causa de los continuos cambios de forma realizados por la extensión de pseudópodos. La mayoría de las amebas viven libres en el suelo o en el agua y son organismos que fagocitan presas pequeñas (Stainer *et al*, 1996).

Las amebas pueden ser testáceas o sin testa (amebas desnudas). Los núcleos patentes tienen nucléolos visibles, son heterótrofos y tienen gránulos de reserva de polifosfatos (Zornoza, 2010a).

En la Figura 3 se observan dos imágenes, una correspondiente a una ameba grande desnuda y otra representa una ameba con testa.

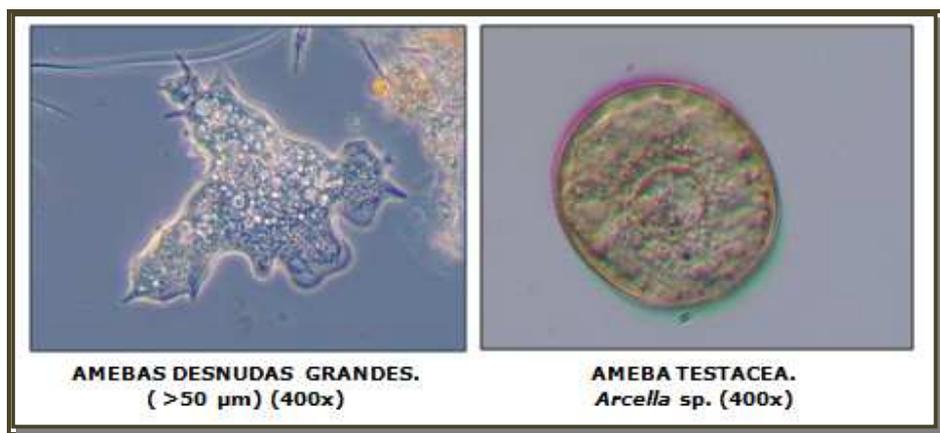


Figura 3. Imágenes de Amebas Testáceas y de Amebas Desnudas Grandes (Fotos: Andrés Zornoza).

- Protozoos Parásitos: *Sporozoa*.

Todas las especies pertenecientes al grupo *Sporozoa* son productoras de esporas y no tienen medios de locomoción aparente, es decir, carecen de cilios o flagelos. Todos ellos son protozoos parásitos que exigen la presencia de un organismo huésped (como los humanos, animales y los peces) para completar su ciclo de vida. Por lo general, obtienen los nutrientes mediante la absorción de moléculas orgánicas en el organismo huésped (Horan, 2003).

Los protozoos parásitos a menudo tienen ciclos de vida muy complicados y son capaces de explotar una amplia gama de nichos ecológicos en el cuerpo humano, incluyendo la piel, ojos, boca, intestino, la sangre, el bazo, el hígado y el músculo, con una condición médica asociada (Horan, 2003).

Según la relación entre la calidad del efluente del decantador secundario con la presencia de protozoos se sugiere que ciertos protozoos e incluso determinadas especies de ciliados pueden utilizarse como indicadores del rendimiento de la planta. Por lo tanto un análisis microscópico de la biomasa es un método rápido y sencillo para indicar el estado actual y posibles cambios bruscos ocurridos en el funcionamiento de la planta (Seviour, *et al* 2010).

Existen publicaciones donde se afirma que la presencia de la comunidad de ciliados puede utilizarse como indicador del funcionamiento de la planta, por ejemplo si tiene alta o baja carga, una aireación adecuada o un buen tiempo de retención celular. Los ciliados reptantes y la mayoría de los ciliados sésiles son deseados. Sin embargo algunos ciliados sésiles como *Opercularia* ssp. y *Vorticella microstoma*, los nadadores bacterívoros y pequeños flagelados indican una mala calidad del efluente (Seviour *et al*, 2010).

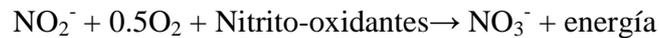
Pajdak-Stós *et al.* (2010) observaron en sus estudios que una gran abundancia de ciliados reptantes no afecta negativamente la eliminación de N-NH_4^+ en las plantas de tratamiento de aguas residuales, sin embargo, con los cambios en el tamaño de la colonia de bacterias nitrificantes observaron un aumento en la cantidad de éstos ciliados.

Las nuevas tecnologías como los tratamientos avanzados de eliminación de nutrientes o biorreactores de membrana presentan características biológicas muy diferentes a los sistemas convencionales (Serrano *et al*, 2008). Los flagelados son miembros estables en la comunidad biológica de eliminación de Nitrógeno (Pérez-Uz *et al*, 2010).

1.3. Nitrificación.

La nitrificación biológica es la conversión u oxidación del ion amonio a nitrito y posteriormente a ion nitrato. Durante este proceso, el oxígeno es añadido a los iones por un único grupo de

microorganismos, las bacterias nitrificantes. A continuación se presentan las reacciones de nitrificación (Gerardi, 2002).



A pesar de que los iones amonio y amoniaco son las formas reducidas del nitrógeno, es el ion amonio el que es oxidado durante la nitrificación. Las cantidades de ambos iones en el tanque de aireación dependen del rango de temperatura, siendo el ideal entre 10°C a 20°C y un pH de 7 a 8,5. Bajo estas condiciones operacionales cerca del 95% de la forma reducida de nitrógeno viene representada por el ion amonio (Gerardi, 2002).

La nitrificación es un proceso clave en el ciclo del nitrógeno en muchos ecosistemas. Por ejemplo en los ecosistemas terrestres este proceso es de crucial importancia debido a que a la larga regula directa o indirectamente el balance del nitrógeno inorgánico (formas de N) en los suelos, la lixiviación del nitrato en las aguas subterráneas y la emisión de óxidos de N desde los suelos (Attard, 2010). Para una mayor comprensión de este proceso a continuación se explica el Ciclo del Nitrógeno.

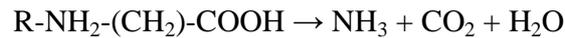
1.3.1 Ciclo del Nitrógeno.

El nitrógeno presente en las aguas residuales urbanas generalmente se encuentra en forma de amonio, urea, ácido úrico, proteínas, azúcares aminados, aminos, entre otros. Gracias a la acción de las bacterias, el nitrógeno orgánico es transformado a ión amonio. Como consecuencia de la actividad de los microorganismos proteolíticos, las proteínas son degradadas para formar aminoácidos, y a su vez la degradación de los aminoácidos para formar amonio es realizada por los organismos amonificantes (Catalán, 1997).

Seguidamente el ión amonio es utilizado por las algas para la síntesis de material celular o bien por bacterias nitrificantes para el proceso de nitrificación cuyo producto final serán los iones nitrato.

El compuesto orgánico con mas nitrógeno es la urea, la cual es fácilmente hidrolizada por la encima ureasa, a amoníaco y anhídrido carbónico, por lo tanto la liberación del amoniaco se produce muchas veces antes de llegar las aguas residuales a la EDAR (Catalán, 1997).

Cuando un organismo muere se transforma el nitrógeno de los aminoácidos en amoniaco mediante el proceso de amonificación:



Este proceso reintroduce el amoniaco o el ion amonio en el ciclo restaurando el mismo en la naturaleza. Para completar el ciclo del nitrato y nitrito, mediante la acción de las bacterias desnitrificantes, son convertidos al estado gaseoso del N_2 o N_2O (Catalán, 1997). Este ciclo completo se muestra en la Figura 4.

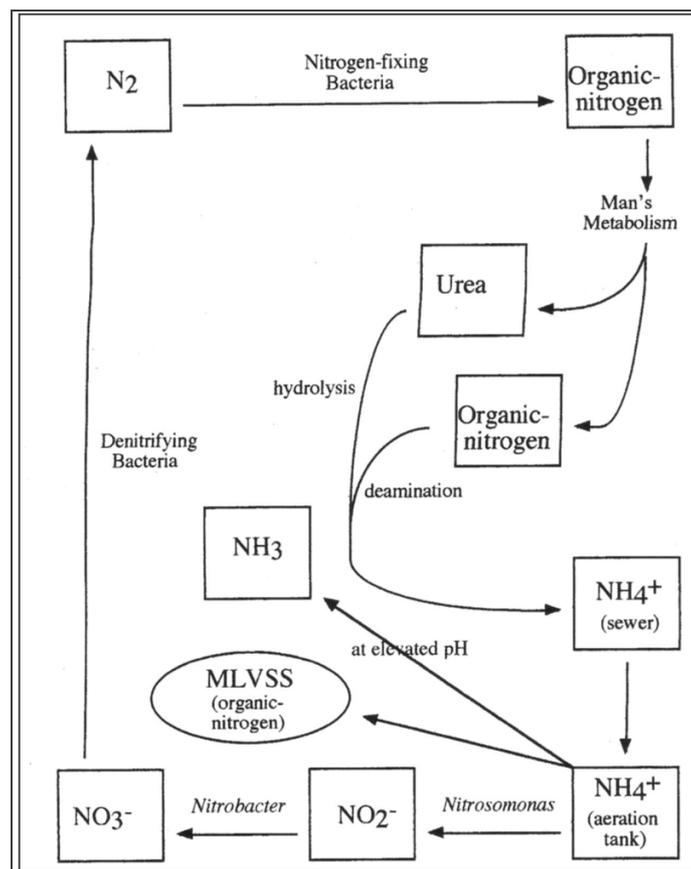


Figura 4 Ciclo del Nitrógeno en Aguas Residuales (Gerardi, 2002).

1.3.2 Factores que afectan a la nitrificación.

El proceso de nitrificación es un paso crítico en la depuración de aguas, debido a la baja tasa de crecimiento de las bacterias nitrificantes, a la extremada sensibilidad a los cambios del sistema y a sustancias inhibidoras que limitan su crecimiento y su actividad. A continuación se presentan los principales factores de los cuales depende la nitrificación (Bitton, 1994; González *et al*, 2010).

- Temperatura

La temperatura es el factor operacional más influyente en el crecimiento de las bacterias nitrificantes. Hay una importante reducción en la velocidad de nitrificación con la disminución de la temperatura. Por el contrario, la tasa de crecimiento de las bacterias nitrificantes aumenta considerablemente con la temperatura en el rango de 8°C a 30°C, con un aumento del 10 % por cada 1°C de aumento de la temperatura en el género *Nitrosomonas* (Gerardi, 2002).

En general para valores bajos de temperatura, la velocidad del proceso se hace muy pequeña, siendo muy difícil que se lleve a cabo la nitrificación; en estas situaciones es necesario trabajar con edades de fango altas para que pueda llevarse a cabo el proceso (González *et al*, 2010).

Por debajo de los 10 °C la tasa de nitrificación cae de forma brusca. Por encima de los 10°C la nitrificación aumenta casi de forma proporcional a la temperatura. Las *Nitrosomonas* aisladas de los fangos activos tienen una tasa de crecimiento óptimo a 30°C, por tanto, generalmente ésta se considera la temperatura ideal para el proceso de nitrificación. Por debajo de los 4°C no hay crecimiento de *Nitrosomonas* ni de *Nitrobacter*, tal como se observa en la Tabla 1.

Tabla 1. Temperatura y nitrificación (Gerardi, 2002)

Temperatura	Efecto sobre la nitrificación
> 45°C	Se para la nitrificación
28°C a 32 °C	Rango de temperatura óptimo
16 °C	Aproximadamente el 50% de la velocidad óptima
10 °C	Reducción significativa de la velocidad de nitrificación. 20% de la velocidad óptima.
< 5°C	Se para la nitrificación.

Debido a la disminución de la actividad y la reproducción de bacterias nitrificantes en temperaturas frías, es necesario, bajo estas condiciones, un aumento en tiempo de retención celular (TRC) y de esta manera la nitrificación será efectiva, véase la Tabla 2. (Gerardi, 2002).

Tabla 2. Temperatura y TRC requerido para la nitrificación (Gerardi, 2002).

Temperatura	Tiempo de Retención Celular
10°C	30 días
15°C	20 días
20°C	15 días
25°C	10 días
30°C	7 días

Wang *et al.* (2010) observaron que durante el invierno, hay poca actividad en la biomasa para la eliminación del nitrógeno N-NH₄⁺ y nitrógeno total (NT). Por ejemplo en una EDAR que emplea la Tecnología cíclica de fangos activos (Cyclic Activated Sludge Technology CAST), cuando se encontraba en invierno a una temperatura de 10-15 °C, aun incrementándose el oxígeno disuelto (OD), la eliminación de N-NH₄⁺ y NT fue poco efectiva. Por el contrario durante el verano, a 27-30°C las eliminaciones de N-NH₄⁺ y NT fueron eficientes, 51 ± 7 % y 42 ± 7% respectivamente.

La inhibición por temperaturas bajas es mayor para *Nitrobacter* que para *Nitrospira*, por lo tanto es común que los iones nitrito se acumulen a bajas temperaturas (Gerardi, 2002).

- Alcalinidad y pH

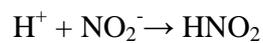
El pH influye sobre la tasa de crecimiento de las bacterias nitrificantes. Se ha observado que la tasa máxima de nitrificación se produce entre valores de 7,2 a 9,0 aproximadamente, a valores inferiores a 6,5 la velocidad de nitrificación se reduce de forma brusca (González *et al.*, 2010).

Generalmente las aguas residuales son alcalinas, reciben su alcalinidad de las aguas potables, compuestos presentes en las infiltraciones de las aguas subterráneas y de químicos procedentes del sistema de alcantarillado (Gerardi, 2002).

Durante el proceso de nitrificación se pierde alcalinidad. Esta pérdida se produce por el uso de la alcalinidad como fuente de carbono por las bacterias nitrificantes y por la producción de iones hidrógeno (H^+) y de iones nitritos durante la nitrificación (Gerardi, 2002).



Al producirse los iones de hidrógeno durante la oxidación del amonio, también se produce ácido nitroso (HNO_2), disminuyéndose la alcalinidad. La cantidad de ácido nitroso y de iones nitrito producidos depende del pH del tanque de aireación (Gerardi, 2002).



La alcalinidad se refiere a los productos químicos presentes en las aguas que son capaces de neutralizar ácidos. Hay una gran variedad de productos químicos en las aguas residuales que proporcionan alcalinidad, estos químicos son bicarbonatos (HCO_3^-), carbonatos (CO_3^{2-}) e hidróxidos (OH^-) de calcio, magnesio y sodio (Gerardi, 2002).

A continuación se presenta la Tabla 3 donde se encuentran los diferentes rangos de pH que influyen en el proceso de nitrificación:

Tabla 3. Influencia del pH en el proceso de nitrificación (Gerardi, 2002)

pH	Impacto en la nitrificación.
4,0 a 4,9	Presencia de bacterias nitrificantes; ocurre nitrificación organotrófica.
5,0 a 6,7	Nitrificación por bacterias nitrificantes. Velocidad de nitrificación lenta.
6,7 a 7,2	Nitrificación por bacterias nitrificantes. Velocidad de nitrificación aumenta.
7,2 a 8,0	Nitrificación por bacterias nitrificantes. Velocidad de nitrificación constante.

- Necesidad de Oxígeno

La concentración de oxígeno disuelto puede convertirse en un factor limitante, debido a que la velocidad de crecimiento de las bacterias autótrofas nitrificantes se reduce significativamente a concentraciones bajas de oxígeno disuelto (OD) (González *et al*, 2010).

La concentración óptima de OD para lograr una buena nitrificación es relativamente baja, a partir de 2 a 3 mg/L. (Gerardi, 2002).

Los factores responsables de la limitada cantidad de OD para la nitrificación son la falta de difusión de oxígeno a través de los flóculos y la competencia por el oxígeno por parte de otros organismos aerobios. El aumento de la concentración de OD puede acelerar la nitrificación, permitiendo una mejor penetración de OD en las partículas del flóculo y alimentando a las bacterias nitrificantes (Gerardi, 2002).

A continuación se presenta la Tabla 4 donde se observa la influencia de la concentración de oxígeno disuelto en el proceso de nitrificación:

Tabla 4. Concentración de OD y grado de nitrificación alcanzada (Gerardi, 2002).

Concentración de OD	Nitrificación alcanzada
< 0,5 mg/L	Muy poca nitrificación, si ocurre.
0,5 a 1,9 mg/L	Nitrificación limitada
2,0 a 2,9 mg/L	Nitrificación significativa
≥ 3,0 mg/L	Máxima nitrificación.

El OD debe estar bien distribuido en el tanque de aireación y su nivel no debe ser inferior a 2mg/L. Para oxidar 1 mg de amonio son necesarios 4,6 mg de O₂ (Bitton, 1994).

Por otra parte respecto a la influencia del OD en la nitrificación parcial, Lin Yen *et al.* (2010) observaron en estudios realizados en un fermentador continuo que el porcentaje de NOB en el total de la comunidad bacteriana se incrementaba del 0% al 30% cuando aumentan los niveles de OD desde un 0,15 mg/L a un 0,5 mg/L, mientras que el porcentaje de las AOB cambia muy poco en las distintas fases. Por tanto los bajos niveles de OD pueden lograr una nitrificación parcial.

- Concentración de Amonio y nitrito.

Los nutrientes pueden afectar y limitar la síntesis celular y el crecimiento bacteriano. Los principales nutrientes inorgánicos necesarios para los microorganismos son: N, S, P, K, Mg, Ca, Fe, Na, Cl (Stanier *et al.*, 1986).

El crecimiento de las bacterias amonio-oxidantes y nitrito oxidantes siguen la cinética de Monod y depende de las concentraciones de amonio y de nitrito respectivamente (Bitton, 1994).

- BOD₅/TKN

En el agua residual existe una gran variedad de compuestos que sirven de sustratos para las bacterias que se encuentran en un sistema de fangos activos. Estos sustratos proveen a las bacterias de carbono y de energía para la actividad bacteriana, crecimiento y reproducción. La demanda bioquímica de oxígeno (DBO) que se encuentra en un proceso de lodos activos incluye la total (DBOt), particulada (DBOp), soluble (DBOs), coloidal (DBOco), carbonosa (DBOc) y nitrogenada (DBOn) (Gerardi, 2002).

Las reacciones bioquímicas de esta actividad metabólica se resumen en reacciones de síntesis de nuevos organismos, reacciones de producción de energía, para el desarrollo de su actividad y reacciones de degradación de los microorganismos. En estas tres reacciones las bacterias consumen oxígeno, hasta que el sustrato disponible se agota, comenzando la fase de metabolismo endógeno, caracterizado por un consumo mínimo de oxígeno. La DBO mide el consumo de oxígeno en una muestra causado por las reacciones indicadas.

La materia orgánica no sólo proporciona energía para las bacterias heterótrofas y a las bacterias nitrificantes sino que también proporciona energía para las formas de vida más complejas presentes en el proceso de fangos activos y, que incluyen a los protozoos, rotíferos y nemátodos. Las formas de vida más altas obtienen energía y el carbono cuando los protozoos consumen bacterias y los rotíferos y nemátodos a su vez consumen a las bacterias y a los protozoos (Gerardi, 2002).

- Sustancias Tóxicas.

Las bacterias nitrificantes son muy sensibles a numerosas sustancias tóxicas que pueden inhibir su crecimiento, provocando una disminución en la velocidad de nitrificación o produciendo una gran toxicidad que pare completamente el proceso de nitrificación a causa de la muerte de estas bacterias (Bitton, 1989).

Los compuestos más tóxicos para las bacterias nitrificantes son el cianuro, tiourea, fenoles, anilinas y metales pesados como plata, mercurio, níquel, cromo, cobre y zinc (Bitton, 1994).

La inhibición es temporal, en cambio la toxicidad se refiere a la pérdida permanente de la actividad enzimática o a daños irreversibles en la estructura celular. Aunque las bacterias nitrificantes pueden superar la inhibición aclimatándose y de este modo reparando los sistemas dañados de la enzima, la inhibición crónica puede reducir significativamente la tasa de reproducción de las bacterias, lo que genera un "lavado" de la población al perder bacterias en el efluente del decantador secundario o de los lodos (Gerardi, 2002).

Debido a la relativamente pequeña cantidad de energía disponible para la aclimatación, las bacterias nitrificantes son "sensibles" a muy bajas concentraciones de compuestos inorgánicos y compuestos orgánicos, véase la Tabla 5.

Tabla 5. Concentraciones inhibitorias de algunos residuos Inorgánicos y Orgánicos (Gerardi, 2002)

Compuesto Inorgánico	Concentración [mg/L]	Compuesto Orgánico	Concentración [mg/L]
Cromo (hexavalente)	0,25	Alcohol Alílico	20,0
Cromo (trivalente)	0,05	Anilina	8,0
Cobre	0,35	Cloroformo	18,0
Cianuro	0,50	Mercaptobenzotiazol	3,0
Mercurio	0,25	Fenol	6,0
Níquel	0,25	Escatol	7,0
Plata	0,25	Tioacetamida	0,5
Sulfato	500	Tiourea	0,1
Zinc	0,30		

Wells *et al.* (2009) observaron que a pesar de que el cromo, níquel, mercurio, cadmio, zinc y cobre han demostrado tener efectos inhibitorios sobre la actividad de las bacterias amonio-oxidantes (AOB) en cultivo puro y mixto, sólo el cromo y el níquel afluente tienen una correlación significativa con la variabilidad AOB.

Tras haber explicado cada uno de los factores que afectan al proceso de nitrificación a continuación se presenta la Tabla 6 donde se recogen las condiciones necesarias para el crecimiento óptimo de las bacterias nitrificantes (U.S. EPA, 1977).

Tabla 6. Condiciones Óptimas de Nitrificación (Adaptación del U.S EPA, 1977).

Característica	Valor
Rango de pH (95% nitrificación)	7,2–8,4
Temperaturas permisibles (95% nitrificación), °C	15-35
Temperatura Óptima, °C (Aproximadamente)	30
Nivel de OD al caudal punta, mg/L	> 1,0
SSVLM, mg/L	1200-2500
Metales pesados inhibidores de la nitrificación (Cu, Zn, Cd, Ni, Pb, Cr)	< 5 mg/L
Tóxicos orgánicos inhibidores de la nitrificación:	
Solventes Halogenados	0 mg/L
Fenol y Cresol	< 20 mg/L
Cianuros y todos los compuestos de los cuales el ácido cianhídrico se libera en la acidificación	< 20 mg/L
Requerimiento de Oxígeno (estequiométrico, mg O ₂ /mg NH ₃ -N)	4,6

1.4. Técnicas Moleculares para la determinación de las poblaciones microbianas

Actualmente están disponibles varias técnicas moleculares para investigar la estructura y función de las comunidades microbianas y entender la supervivencia de patógenos y parásitos en muestras ambientales (Bitton, 2011).

Las técnicas moleculares más utilizadas en la actualidad para la identificación microbiológica son la PCR y la técnica FISH. Ambas se describen a continuación.

1.4.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) consiste en amplificar fragmentos discretos de ADN mediante la generación de millones de copias del ADN diana (Bitton, 2011).

Durante la división celular, se hacen dos nuevas copias de ADN y se transmite un conjunto de genes a cada célula hija. Las copias de genes aumentan exponencialmente a medida que aumenta el número de generación. La PCR *in vitro* simula el proceso de duplicación del ADN y puede crear millones de copias de la secuencia de ADN diana (Bitton, 2011).

1.4.2 Hibridación *in situ* con sondas marcadas con fluorocromos (FISH).

La técnica FISH utilizando sondas de oligonucleótidos específicas se ha convertido en uno de los métodos más utilizados en el estudio directo de los microorganismos presentes en los sistemas complejos sin cultivo previo ni aislamiento (Nielsen *et al*, 2009).

El método FISH hace posible en un plazo relativamente corto la recuperación de información sobre las identidades filogenéticas de las células en una muestra, puesto que también mantiene la morfología de las células, suministrando información sobre la distribución espacial, así como el número de organismos identificados (Nielsen *et al*, 2009).

La técnica se basa en la hibridación directa de la bacteria diana con una sonda complementaria de una región del gen 16S rRNA o 23S rRNA para bacteria, mientras para *Eucarya* es más utilizada una región del gen 18S (Amann, 1995). El elevado número de moléculas de rRNA (10^3 - 10^5) representa una gran ventaja en la aplicación de la técnica FISH debido al aumento de su sensibilidad (Amann, 1994).

Una secuencia de sonda de DNA puede unirse con una secuencia complementaria de RNA (16S rRNA o 23S rRNA), produciéndose un híbrido DNA:RNA. Debido a que la sonda está marcada, los híbridos formados pueden detectarse fácilmente con un microscopio de epifluorescencia. La especificidad de la sonda puede ajustarse a los diferentes niveles taxonómicos (dominio, phylum, clase, familia, género y especie) para la identificación de las bacterias en sus diferentes comunidades naturales (Amann *et al*, 1995).

En la Figura 5 se muestra el fenómeno ocurrido en las células bacterianas durante la técnica FISH. En el recuadro 1 las sondas contactan a las muestras, en el 2 las sondas entran en las células, luego en el 3 las sondas se unen específicamente, seguidamente en el recuadro 4 las células no diana no presentan fluorescencia y por último, en el recuadro 5, las células diana emiten fluorescencia.

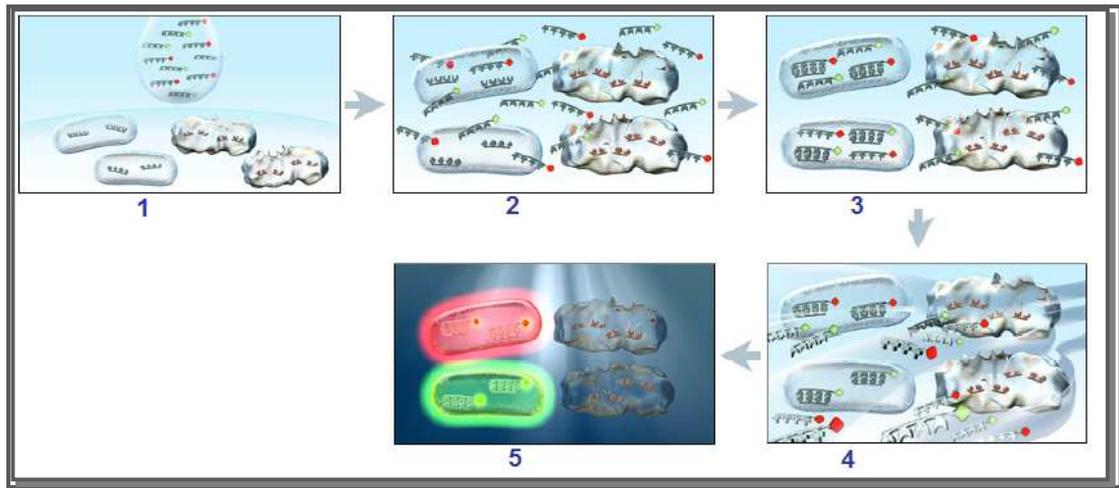


Figura 5. Hibridación in situ (FISH).

La técnica FISH generalmente consiste en los siguientes pasos consecutivos: la síntesis de la sonda, la fijación de células, la hibridación, lavado, tratamiento de pre-análisis, y análisis de la muestra (Yilmaz *et al*, 2010). Los pasos serán descritos a continuación:

- Síntesis de la sonda:

El diseño de las sondas es la parte más crítica de la técnica FISH, puesto que tienen que ser lo suficientemente específicas para unirse únicamente a la bacteria que se quiere identificar, tomando en cuenta que en muchos casos se encuentra en presencia de otras bacterias con moléculas de rRNA muy homólogas. El tamaño de las sondas oscila entre 15 y 30 nucleótidos. Para asegurar la especificidad de las sondas, los dos parámetros determinantes son la temperatura y la concentración de formamida en el tapón de hibridación (Alonso *et al*, 2009).

La concentración de formamida es la que favorecerá las condiciones de especificidad de la sonda, debido a que la temperatura de hibridación generalmente se mantiene constante en los

protocolos. La formamida disminuye la temperatura de unión de las sondas mediante el debilitamiento de los puentes de hidrógeno. Este compuesto disminuye la temperatura de fusión de los híbridos DNA-RNA en 0,72 °C por cada 1% de formamida utilizada y permite realizar la hibridación entre los 30-50 °C (Alonso *et al.*, 2009).

La clasificación taxonómica de los organismos amonio-oxidantes y sus respectivas sondas utilizadas en la técnica FISH se encuentra en la Figura 6 a continuación.

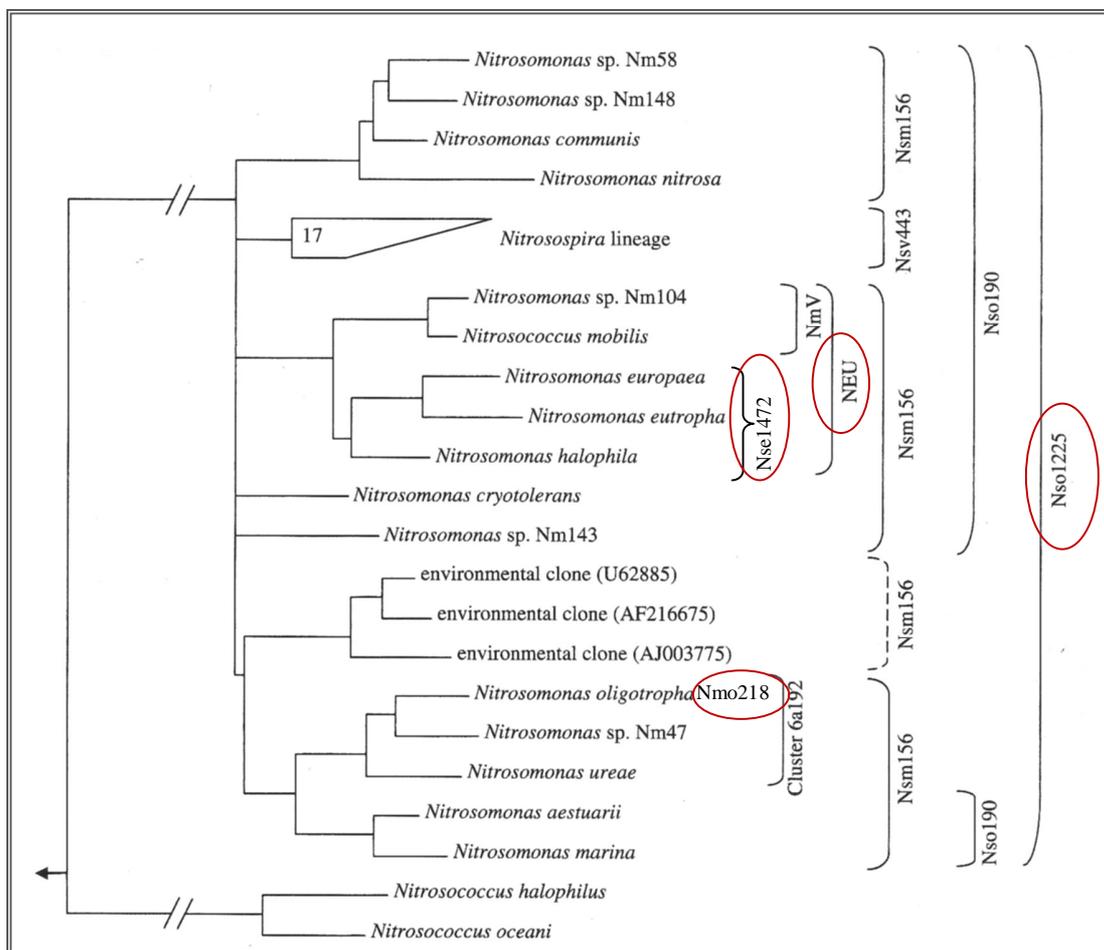


Figura 6. Árbol filogenético del gen 16S rARN basado en los linajes principales de bacterias amonio-oxidantes conocidas (Daims *et al.*, 2009).

Por otra parte, a continuación se presentan otros árboles filogenéticos más específicos donde se incluyen algunas sondas con sus respectivas subespecies identificadas que fueron utilizadas en este estudio.

La sonda Nmo218 utilizada en este estudio identifica las subclases que se observan en la Figura 7.

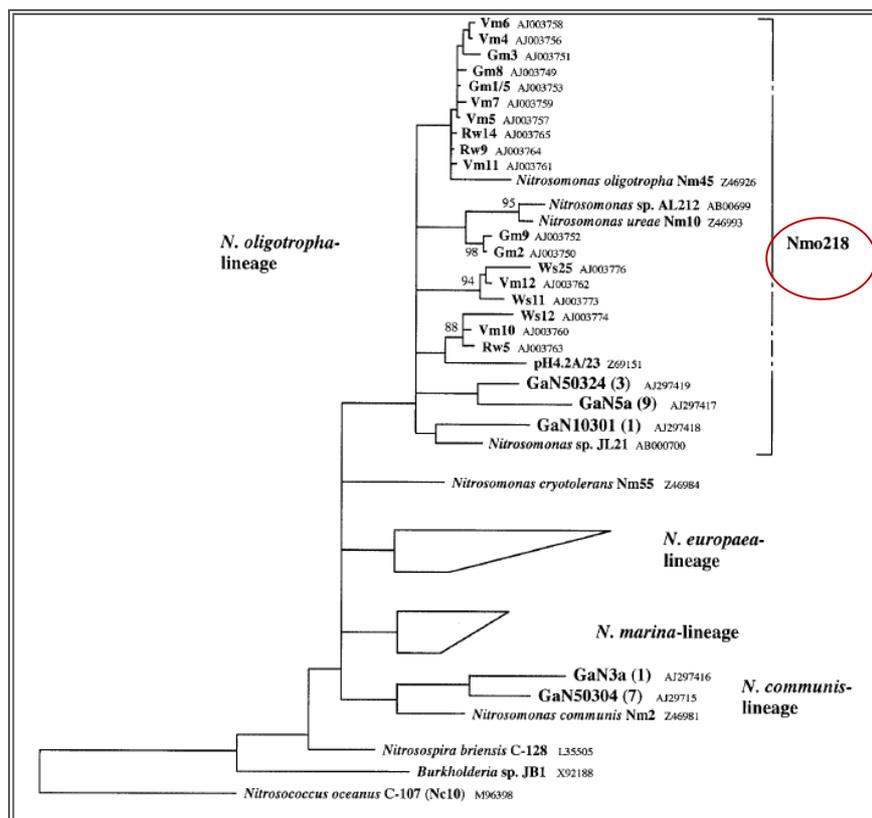


Figura 7. Árbol filogenético del genero *Nitrosomonas* inferido del análisis comparativo del gen 16S rDNA (Gieseke *et al*, 2000).

Otra sonda utilizada en este estudio es la Nse1472, a continuación se presentan las subespecies identificadas por esta sonda.

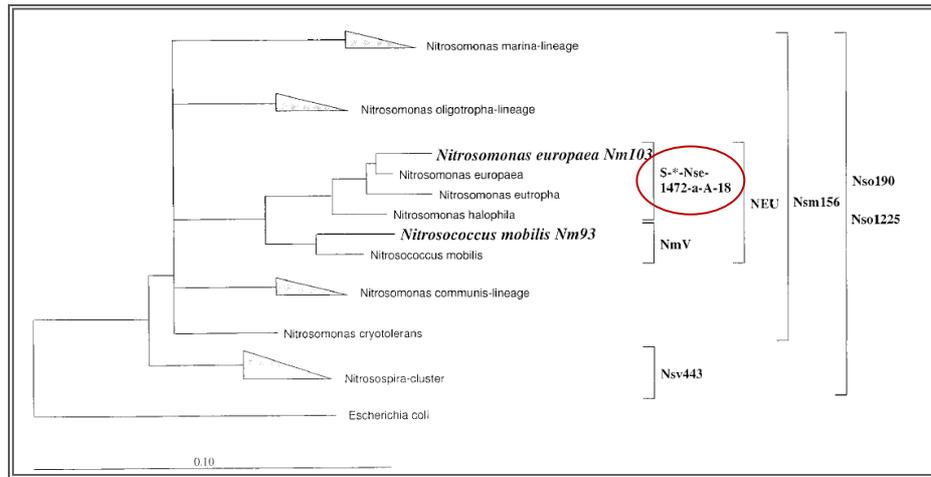


Figura 8. Árbol filogenético que muestra las relaciones de las AOB aisladas *N. mobilis* Nm93 y *N. europaea* Nm103 y otras bacterias cercanas pertenecientes a la subclase *Proteobacteria*. (Juretschko *et al*, 1998).

La clasificación taxonómica de los organismos nitrato-oxidantes y sus respectivas sondas identificativas correspondientes a la técnica FISH se encuentran en la Figura 9.

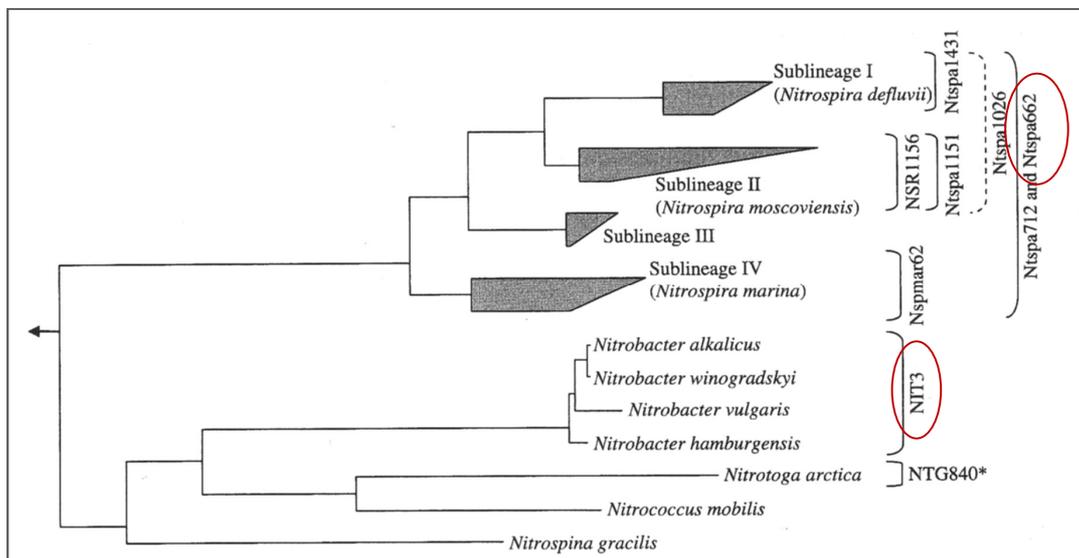


Figura 9. Árbol filogenético del gen 16S ARNr basado en los linajes principales de bacterias nitrato-oxidantes conocidas (Daims *et al*, 2009).

- Fijación de las células.

La fijación de las bacterias tiene como objetivo inactivar las células microbianas, conservar su morfología, permeabilizarlas para una mejor penetración de la sonda e inhibir cualquier actividad de las enzimas que pueden dar lugar a la lisis celular (Yilmaz *et al*, 2010).

Para la permeabilización de las células se utilizan detergentes como el SDS (sodio dodecil sulfato). El reactivo utilizado para la fijación dependerá de la estructura de la pared celular de la bacteria (Gram-positiva, Gram-negativa) (Alonso *et al*, 2009).

- Hibridación

La hibridación implica la incubación de las células en un tampón de hibridación en condiciones favorables. Los factores que afectan la hibridación de DNA:RNA deben ser considerados y ajustados, e incluyen la temperatura y las concentraciones de Cloruro de Sodio (Yilmaz *et al*, 2010). En el capítulo correspondiente a Materiales y Métodos se encuentra descrito el protocolo de hibridación completo así como también la preparación de la solución de hibridación según el porcentaje de formamida requerido.

- Lavado.

La etapa de lavado tiene como objetivo eliminar el exceso de sondas sin hibridar de las muestras sin comprometer su sensibilidad y especificidad, mediante la creación de un disipador de la sonda fuera de las células, imitando las condiciones de rigor de la etapa de hibridación (Yilmaz *et al*, 2010). Este paso se realiza introduciendo los portas luego de la hibridación en la solución de lavado durante 15-20 minutos (Alonso *et al*, 2009).

En el capítulo correspondiente a Materiales y Métodos se encuentra descrito el procedimiento para la etapa de lavado así como también la preparación de la solución de lavado.

- Tratamiento de pre-análisis

Cualquier tratamiento de pre-análisis debe evitar la disociación de los híbridos y el blanqueo de los tintes fluorescentes para mantener la sensibilidad de la sonda entre el lavado y el paso de análisis (Yilmaz *et al*, 2010).

En la técnica FISH para visualizar posteriormente en el microscopio, después del lavado, se enjuagan y se secan los portaobjetos. Para la visualización posterior se aplican a los pocillos soluciones de montaje como octanos 1,4-diazabicyclo (DABCO), Citifluor o Vectashield que evitan la pérdida de fluorescencia, luego se cubren. Estos procedimientos aumentan la vida útil de los portas pudiéndose almacenar durante varias semanas en la oscuridad (Yilmaz *et al*, 2010).

- Análisis de las muestras

Las muestras de FISH se analizan mediante la señal de fluorescencia de las células que contiene la sonda / híbridos de destino. Para generar esto, el fluorocromo es excitado con luz en una longitud de onda apropiada. En general, las lámparas de arco (principalmente mercurio y quemadores de xenón) y el láser se utilizan para la excitación. La respuesta viene en forma de luz emitida con una longitud de onda del espectro en función del fluorocromo utilizado (Yilmaz *et al*, 2010).

La fluorescencia se produce gracias al uso de fluorocromos, los cuales son sustancias que tienen la propiedad de absorber energía de una longitud de onda específica y volverla a emitir con una longitud de onda mayor (con menor energía). La cantidad de energía emitida dependerá del fluorocromo utilizado. Los fluorocromos de última generación son más foto estables y emiten una señal de fluorescencia más intensa (Roncero, 2009; Reyes, 2009).

Mediante el microscopio y la técnica FISH se puede visualizar la disposición espacial de las células, por ejemplo, en los flóculos, se utiliza la microscopía con epifluorescencia y el recuento manual (Wagner *et al*, 1994). El análisis de imagen con un programa adecuado es la técnica de cuantificación que se utiliza actualmente (Yilmaz *et al*, 2010).

El barrido con el microscopio confocal láser permite captar la tercera dimensión de los agregados celulares, lo que permite la cuantificación de las células marcadas como una proporción o porcentaje de biovolumen. La intensidad de la fluorescencia en las sondas también se puede cuantificar mediante microscopía, basándose en las intensidades de los píxeles de las células hibridizadas (Yilmaz *et al*, 2010).

Una ventaja importante de FISH en comparación con todas las demás técnicas en ecología microbiana es que puede determinarse la abundancia de microorganismos detectados directamente, además de su filogenética y de su morfología (Daims *et al*, 2002).

2. Objetivos

El desarrollo de este trabajo tiene como objetivo principal la identificación y cuantificación de la población de bacterias nitrificantes presentes en el fango activo de la EDAR de Quart Benager, durante un período de un año con muestras tomadas quincenalmente. Analizar su evolución temporal, así como también determinar las posibles relaciones entre las variables operacionales, físico químicas y la presencia de protozoos que puedan afectar la actividad y crecimiento de dichas poblaciones microbianas.

Los objetivos específicos que se pretenden alcanzar son:

1. Identificar diversas subclases de bacterias amonio oxidantes (AOB) y nitrito oxidantes (NOB) mediante la utilización de sondas específicas con la técnica FISH.
2. Cuantificar en cada muestra los grupos de bacterias nitrificantes estudiadas con respecto a la población total de bacterias.
3. Estudiar las correlaciones existentes entre la dinámica poblacional de las bacterias nitrificantes y su abundancia con los parámetros físico-químicos, biológicos y operacionales de la EDAR.
4. Estudiar la abundancia de distintas especies de AOB y NOB a lo largo del tiempo y valorar su contribución a la eliminación de amonio (N-NH_4^+).
5. Determinar la relación de los grupos de protozoos presentes con el proceso de nitrificación, su predación y su actividad bioindicadora en este proceso.

3. Materiales y Métodos

En el presente estudio se identificaron las bacterias nitrificantes presentes en el licor mezcla de la EDAR de Quart Benager durante el periodo diciembre 2008-diciembre 2009, mediante la técnica FISH. Se realizó el análisis de imagen para cuantificar la cantidad de estas bacterias y por último se realizó un análisis estadístico para determinar las posibles relaciones entre las variables físico-químicas, biológicas y operacionales y las bacterias estudiadas.

Las variables físico-químicas, operacionales y biológicas que se toman en cuenta en el presente estudio fueron facilitadas por la EDAR de Quart-Benáger, todas estas variables se encuentran tabuladas en el apartado 3.4 del presente capítulo. A continuación se describen los materiales y la metodología empleada para la realización de este trabajo.

3.1. Toma de muestras.

La toma de muestra se realiza en los reactores y en los tanques de aireación generalmente en el mismo punto y a la salida de los mismos.

Las muestras analizadas en este proyecto son proporcionadas por el Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente (IIAMA) y corresponden a la depuradora de Quart Benager ubicada en la Comunidad Valenciana.

La depuradora de Quart Benager tiene un caudal de funcionamiento de 37.735 m³/día, sirve aproximadamente a 243.000 habitantes equivalentes y cuenta con un proceso biológico ocurrido en un reactor Anóxico-Aerobio de geometría rectangular (75 x 20 x 4,5) metros. Esta depuradora cuenta con cuatro reactores en paralelo.

En la Figura 10 se presenta el esquema de la depuradora de Quart Benager.

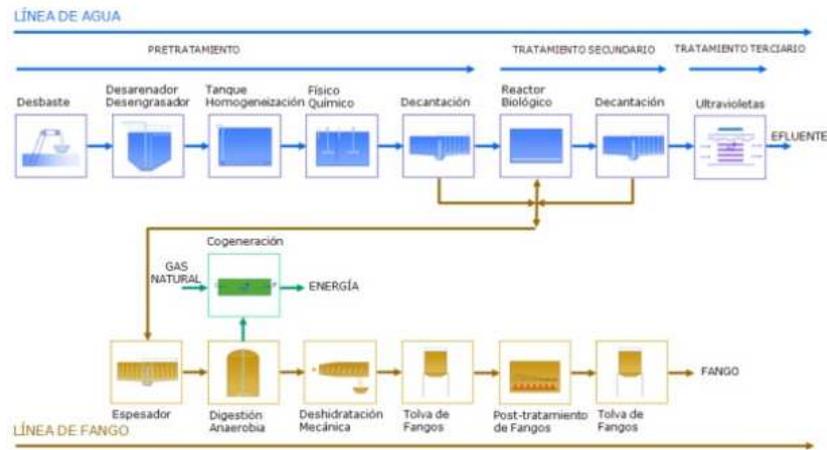


Figura 10. Diagrama de Bloques de la EDAR de Quart Benager (EPSAR).

El muestreo fue llevado a cabo mediante campañas de toma de muestras en cada línea durante un año con una frecuencia quincenal desde diciembre de 2008 hasta diciembre de 2009, esto hace un total de 24 muestras tomadas. Cada campaña tuvo una duración de cuatro días repartidos de la siguiente forma: en los tres primeros días se muestreó afluente al reactor, y en el tercer día se muestreó, además, efluente del decantador secundario.

Las muestras fueron compuestas, obtenidas a partir de la mezcla de muestras simples horarias en relación al caudal. En el cuarto día se tomó una muestra de licor mezcla en el reactor biológico, siendo esta de tipo simple y de carácter puntual a la salida del mismo (Zornoza *et al*, 2010b). En la Figura 11 se presenta un esquema de la campaña indicándose la duración, origen y tipo de muestra.

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

Figura 11 . Esquema campaña de muestreo

Los días 1 y 2 se analizaron en el afluente al reactor los siguientes parámetros: DQO total, DQO soluble y DBO₅, seguidamente se realizó un promedio de cada par de valores obteniéndose un

único valor de cada variable. El día 3 se llevó a cabo un análisis físico-químico completo del afluente y efluente. El objetivo del primer análisis es estudiar la influencia de la carga orgánica y del segundo establecer el rendimiento del proceso biológico (Zornoza *et al*, 2010b).

3.1.1 Parámetros físico-químicos y biológicos

Los parámetros físico-químicos se han determinado siguiendo los procedimientos normalizados (APHA, 1998). La fracción filtrada se obtuvo a través de un filtro de lana de vidrio (Whatman GF/C) con un tamaño de poro de 1,2 μm , la fracción soluble se obtuvo a través de un filtro de 0,45 μm (Grady, 1989).

En la Tabla 7 se encuentran tabulados los parámetros físico-químicos tomados en cuenta en este estudio con sus respectivos días de muestreo.

Tabla 7. Parámetros Físico-químicos y biológicos del afluente, efluente y licor mezcla.

Parámetros físico-químicos en el afluente, efluente y licor mezcla					
Parámetros	Afluente al reactor		Efl. dec. secundario	Licor mezcla	
	Día 1,2	Día 3	Día 3	Parámetros	Día 4
pH	-	x	-	pH	x
Conductividad	-	x	-	Conductividad	x
SST	-	x	x	SSLM	x
SSTV	-	x	x	SSVLM	x
DQO total	x	x	x	Nitrógeno total	x
DQO filtrada	-	x	x	Nitrógeno total clarificado	x
DQO soluble	x	x	x	Fósforo total	x
DBO ₅	x	x	x	Fósforo total clarificado	x
DBO ₅ filtrada	-	x	x	DQO total	x
Nitrógeno total	-	x	x	DQO total clarificado	x
Nitrógeno total soluble	-	x	x		
Nitrógeno amoniacal	-	x	x		
Nitrógeno nitroso	-	-	x		
Nitrógeno nítrico	-	-	x		
Fósforo total	-	x	x		
Fósforo total soluble	-	x	x		
Ortofosfato	-	x	x		
Sulfuros	-	x	-		
Sulfatos	-	x	x		
Tensioactivos aniónicos	-	x	x		

3.1.2 Identificación y recuento de protozoos

El análisis microscópico de las muestras se realizó en un intervalo de tiempo máximo de 24 horas después de la toma de muestras, utilizando un microscopio de contraste de fases Zeiss (modelo Axiostar). La estimación de la densidad de protistas ciliados se llevó a cabo por recuento directo de dos alícuotas de 25 μ l (Madoni, 1988).

Para la estimación de la densidad de pequeños flagelados se examinaron dos réplicas, tomando un volumen de 25 μ l, en la diagonal de la cámara Fuchs Rosenthal (Madoni, 1988). En el caso de las amebas se consideraron dos grupos de amebas desnudas según el tamaño celular: amebas grandes ($>50 \mu$ m) y pequeñas ($<50 \mu$ m) (Zornoza *et al*, 2010b).

3.1.3 Variables Operacionales

En la Tabla 8 se encuentran los datos relativos a los días de la campaña de muestreo de las variables operacionales.

Tabla 8. Parámetros Operacionales (Zornoza *Et al*, 2010b).

Parámetros operacionales.		
	Variable	Unidades
I. DECANTACIÓN PRIMARIA Y SECUNDARIA	Tiempo retención hidráulico	horas
II. REACTOR BIOLÓGICO	Carga másica	kg DBO ₅ /kg SSVLM.d
	Carga volúmica	Kg DBO ₅ /m
	Edad del fango	Días
	Temperatura	°C
	Oxígeno	%
	(< 0.8, 0.8-2 >2 mg/L)	

Los valores de oxígeno disuelto (OD) en el reactor han sido distribuidos en tres intervalos (<0,8, 0,8-2 y >2 mg/L). Los datos corresponden a medidores en línea situados en la parte final del reactor biológico (Zornoza *et al*, 2010b).

Para obtener un valor global de OD se realizó un promedio multiplicando el porcentaje diario obtenido por su concentración en mg/L. A efectos del presente trabajo se estudió el promedio de OD y el OD inferior a 0,8mg/L, debido a que a estos niveles tan bajos de oxígeno la nitrificación posiblemente se ve afectaba.

3.2. Hibridación Fluorescente *in situ* "FISH".

A continuación se presenta el protocolo que debe realizarse en la técnica FISH.

3.2.1 Fijación de las muestras.

Para realizar la hibridación por fluorocromos *in situ* "FISH" se deben fijar las células transformándolas en estructuras rígidas para que su morfología permanezca intacta e inactivar la actividad enzimática. La fijación de todas las muestras fue realizada en el laboratorio de microbiología del Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente (IIAMA) siguiendo el protocolo para Gram negativas que se describe a continuación:

- Lavar 1 ml de flóculo con 500 µl de PBS, seguidamente añadir 750 µl de PFA y mantenerlo a 4 °C durante 1 a 3 horas.
- Centrifugar la muestra durante 3 minutos y eliminar el fijador.
- Lavar las celular con 500 µl de PBS 1X.
- Resuspender en 500 µl de PBS 1X y añadir 500 µl de etanol frío (4 °C).
- Guardar a -20 °C, se pueden conservar durante varios meses bajo estas condiciones.

La Figura 12 muestra ilustrativamente los pasos a seguir para la aplicación de la técnica FISH.

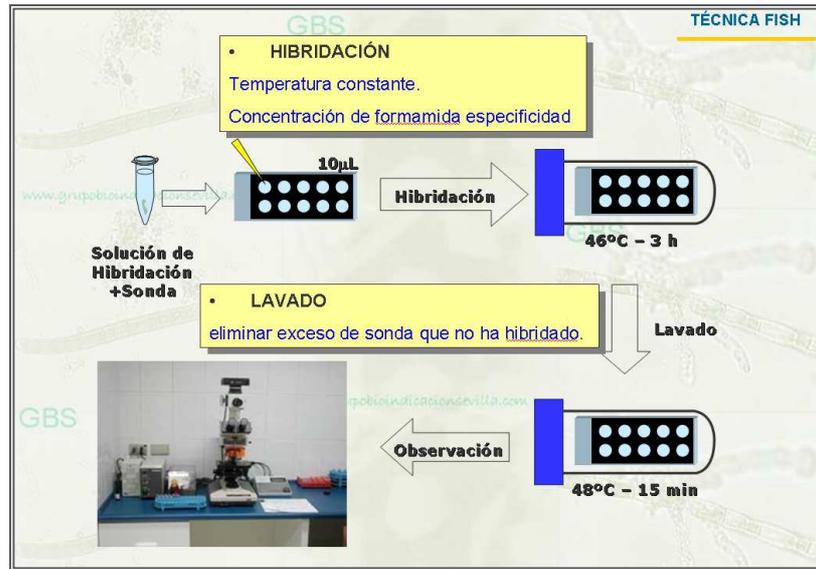


Figura 12. Pasos de la Técnica FISH (Zornoza, 2010a).

3.2.2 Tratamiento de los portaobjetos cubiertos con Teflón.

Se deben tratar los portaobjetos donde se aplican las muestras fijadas a fin de que las células se mantengan en el mismo a pesar de los lavados posteriores a la visualización en el microscopio. El tratamiento que se lleva a cabo se presenta a continuación:

- Lavar con solución de limpieza.
- Enjuagar con agua destilada.
- Secar al aire dejándolo escurrir durante un día. Se deben proteger del polvo ambiental cubriendo con papel de aluminio.
- Cubrir con gelatina por inmersión en la solución de gelatina 0,1% con cromato sulfato potásico 0,01% preparada al momento a una temperatura de 60°C.
- Secar al aire.

A continuación se encuentran los pasos a seguir para realizar la técnica FISH a las muestras tomadas:

3.2.3 Aplicación de las muestras a los portaobjetos FISH.

- Poner un volumen entre 3 y 5 µl de muestra fijada al portaobjetos FISH.

- Secar al aire.
- Deshidratar en etanol 50% durante 3 minutos por inmersión.
- Deshidratar en etanol 80% durante 3 minutos por inmersión.
- Deshidratar en etanol absoluto durante 3 minutos por inmersión.

3.2.4 Hibridación in situ.

- Preparar la solución de hibridación mezclando en un eppendorf de 2 ml los reactivos que se encuentran en la tabla siguiente. Se observa que únicamente cambian las concentraciones de formamida y H₂O MiliQ las cuales varían según la sonda utilizada (Tabla 9).

Tabla 9. Preparación de la solución de hibridación según el porcentaje de formamida requerido.

Reactivo	% de Formamida						
	10%	20%	25%	30%	35%	40%	45%
NaCl 5M [μ l]	360	360	360	360	360	360	360
HCl-Tris 1M [μ l]	40	40	40	40	40	40	40
Formamida [μ l]	200	400	500	600	700	800	900
H ₂ O MiliQ [μ l]	1398	1198	1098	998	898	798	698
SDS 10% [μ l]	2	2	2	2	2	2	2
Volumen Final [μ l]	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000

- Poner 9 μ l de solución de hibridación a cada pocillo que contenga muestra.
- Poner 1 μ l de sondas, repartidos de la siguiente forma: 0,5 μ l de EUBmix (combinación entre EUBI, EUBII y EUBIII) y 0,5 μ l de sonda identificativa de bacterias nitrificantes. Cuando se trabaja con las sondas Ntspa662 y NIT3 se dividen estos 0,5 μ l en partes iguales repartiéndose este volumen en la sonda correspondiente y su competidora. Se debe poner la sonda homogéneamente sobre el pocillo.

- Preparar un tubo tipo falcon de 50 ml con papel de celulosa dentro e introducir el portaobjetos con las muestras en dicho tubo. Se debe mantener en posición vertical.
- Incubar a 46 °C durante 1 hora y 30 minutos.

Para eliminar el exceso de sonda que no ha hibridado y la formamida de los portaobjetos se prepara una solución de lavado mezclando los reactivos presentes en la Tabla 10 dependiendo del porcentaje de formamida que ha sido utilizado en la solución de hibridación.

Tabla 10. Preparación de la solución de lavado.

Reactivo	% de Formamida						
	10%	20%	25%	30%	35%	40%	45%
NaCl 5M [μ l]	4500	2150	1490	1020	700	460	300
EDTA 0,5M [μ l]	-	500	500	500	500	500	500
HCl-Tris 1M [μ l]	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
H2O MiliQ [mL]	44,45	46,3	47,94	47,43	47,75	47,06	48,15
SDS 10% [μ l]	50	50	50	50	50	50	50
Volumen Final [mL]	50	50	50	50	50	50	50

El procedimiento de lavado de los portaobjetos es el siguiente:

- Sacar el portaobjetos de la incubadora e introducirlo en un tubo con la solución de lavado, mantenerlo en un baño de agua a 48 °C durante 10 a 15 minutos protegidos de la luz cubriéndolos con papel de aluminio.
- Sacar el portaobjetos de la solución de lavado y sumergirlo en un vaso con agua MiliQ fría durante un minuto.
- Secar el portaobjetos a temperatura ambiente protegiéndolo de la luz.
- Observar en el microscopio o guardar a -20°C.

3.2.5 Sondas utilizadas.

Para la identificación de la comunidad general de bacterias así como de las bacterias nitrificantes AOB y NOB se utilizaron las sondas que se encuentran en la Tabla 11.

Tabla 11. Sondas utilizadas en este estudio.

Bacteria	Sonda	Especificidad (5' -3')	Especificidad	FA ¹	Referencia
Eubacteria	EUB 338 I	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	<i>Bacteria</i>	0-50	Amann (1990)
	EUB 338 II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	<i>Planctomycetes</i>	0-50	Daims <i>et al.</i> (1999)
	EUB 338 III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	<i>Verrumicrobiales</i>	0-50	Daims <i>et al.</i> (1999)
AOB	Nso 1225	CGCCATTGTATTACGTGTGA ²	β <i>Proteobacteria</i> ³	45	Mobarry <i>et al.</i> (1996)
	Nse1472	ACCCAGTCATGACCCCC	<i>N. europea</i> <i>N.halophila</i> <i>N.eutropha</i>	50	Juretschko <i>et al.</i> (1998)
	Nmo218	CGGCCGCTCCAAAAGCAT	<i>Nitrosomonas oligotropha</i>	35	Gieseke <i>et al.</i> (2001)
	NEU	CCCCCTCTGCTGCACTCTA	<i>N.halophila</i> , <i>eutropha</i> y <i>europea</i> <i>Nitrosococcus mobilis</i> .	40	Wagner <i>et al.</i> (1995)
	CNEU	TTCCATCCCCCTCTGCCG	Competidora ⁴		Wagner <i>et al.</i> (1995)
NOB	Ntspa 662	GGAATTCCGCGTCCTCT	<i>Nitrospira</i> spp.	35	Daims <i>et al.</i> (2001)
	CNtspa 662	GGAATTCCGCGTCCTCT	Competidora ⁴		Daims <i>et al.</i> (2001)
	NIT 3	CCTGTGCTCCATGCTCCG	<i>Nitrobacter</i> spp.	40	Wagner <i>et al.</i> (1996)
	CNIT 3	CCTGTGCTCCAGGCTCCG	Competidora ⁴		Wagner <i>et al.</i> (1996)

¹FA: Porcentaje de formamida.

²Modificada con 4 bases LNA (Alonso *et al.* 2009).

³AOB.

⁴Sonda competidora sin marcar para aumentar la especificidad de la sonda correspondiente Ntspa662 o NIT3.

En total fueron realizadas 144 hibridaciones, siendo este el resultado de la hibridación de las 24 muestras por las seis sondas utilizadas en el presente estudio. Estas sondas se dividen de la siguiente forma: cuatro sondas para identificar AOB (Nso1225, Nmo218, NEU y Nse1472) y dos sondas para identificar NOB (Ntspa662 y NIT3). La Figura 13 muestra la clasificación taxonómica resumida de las bacterias identificadas en el presente estudio.

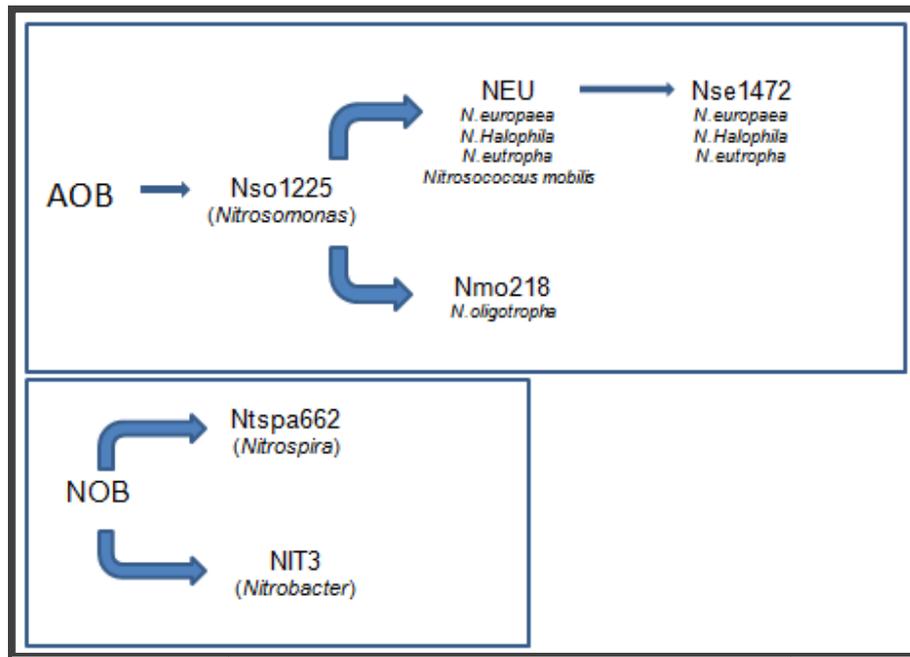


Figura13. Esquema de las sondas utilizadas en el presente estudio para las AOB y NOB.

3.3. Cuantificación de Microorganismos

Una vez realizada la Hibridación *in situ* con las sondas específicas (FISH) se procede a la observación en el microscopio y la toma de imágenes.

El microscopio utilizado fue un microscopio de epifluorescencia Olympus BX 50 equipado con condensador de campo claro, contraste de fases e interferencial de Nomarsky. Las fotografías en color se tomaron con una cámara digital Olympus DP 12 acoplada al microscopio con los filtros: U-MWIB (Fluoresceína, FAM) y U-MWIG (Rodamina, TAMRA).

Antes de colocar el portaobjetos en el microscopio se le añadió a cada pocillo el *Vectashield* para evitar la pérdida de fluorescencia de la muestra. Seguidamente se colocó el portaobjetos en el microscopio y se observó a 60x.

Se realizaron fotos a unos 20 - 25 campos de cada pocillo; por cada campo se adquirieron dos fotos: una correspondiente a las bacterias nitrificantes en estudio (sonda específica) y otra de toda la comunidad bacteriana (sonda EUBmix).

En total se realizaron 3200 fotos aproximadamente, correspondientes a los 72 pocillos de todas las muestras (24 pocillos por cada una de las tres sondas que dieron resultados positivos). La toma de fotos de cada pocillo duró aproximadamente 20 minutos lo que dio un total de 1440 minutos, equivalentes a 24 horas empleadas en la toma de fotos.

Haciendo uso del *software* de cuantificación desarrollado por Borrás, 2008, se realizó el análisis de imagen. El *software* descompone la imagen en escala de grises con valores de 0 (Negro) a 255 (Blanco) facilitando el conteo de píxeles.

El algoritmo del programa permite con un simple ajuste eliminar las partes de la imagen que no son de interés o que son falsos positivos mediante los parámetros *Low_in* y *Gamma_in*. Con el primero se consigue eliminar la parte de la imagen que representa imagen de fondo (*background*) y establece un valor de 0 a 1, por debajo del cual es un falso positivo (Borrás, 2008).

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 (Borrás, 2008).

Todas las imágenes capturadas de cada pocillo se introducen en el *software* de cuantificación desarrollado por Borrás, 2008, generando un archivo en Excel con los porcentajes de las áreas ocupadas por las bacterias estudiadas y su 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).

En la Figura 14 se muestra el flujo de procesos para la cuantificación en el software utilizado.

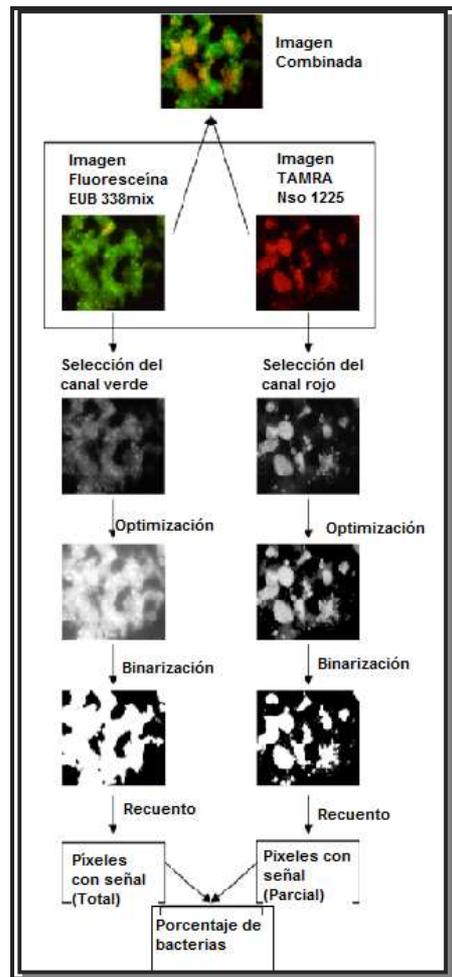


Figura 14 Flujo de procesos para la cuantificación de bacterias.

3.4. Análisis Estadístico.

En el análisis estadístico se emplearon 86 variables medidas (63 variables físico-químicas, 8 variables operacionales y 15 protistas) y 24 muestras, dando lugar a una matriz semejante a la que se muestra en la Figura 15.

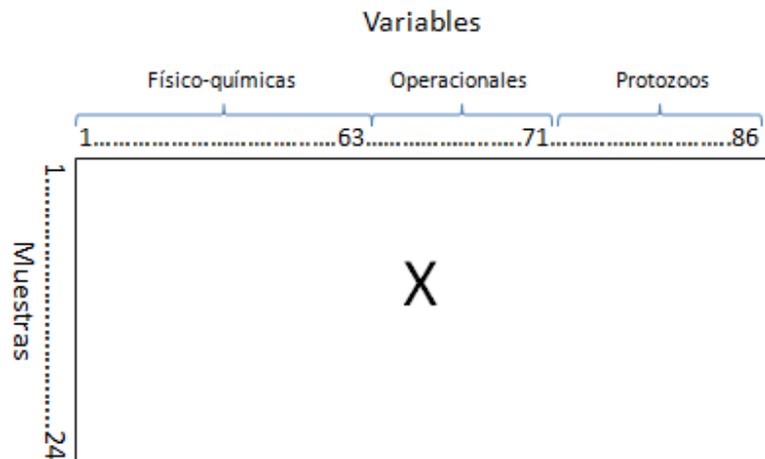


Figura 15. Esquema de la matriz a analizar.

Se realizaron 24 muestreos durante el período diciembre 2008-diciembre 2009. La Tabla 12 contiene las fechas correspondientes a cada número de muestra.

Tabla 12. Números de muestras con sus fechas de muestreo correspondientes.

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

Tabla 12. Números de muestras con sus fechas de muestreo correspondientes. Continuación.

Nº de muestra	Fecha de Muestreo
20	21/10/2009
21	04/11/2009
22	18/11/2009
23	16/12/2009
24	29/12/2009

En el análisis estadístico primeramente se realizó un resumen estadístico donde se tabularon los valores mínimos, máximos, la media y la desviación estándar de cada una de las variables operacionales y físico-químicas y también los protistas presentes en el licor mezcla.

Posteriormente se emplearon diferentes técnicas estadísticas complementarias para tratar de relacionar los cambios en la composición y abundancia de las AOB y de las NOB con los parámetros físico-químicos, operacionales y biológicos.

Primero se realizó un análisis bivariante con el fin de establecer vínculos entre la abundancia de las AOB y NOB con los parámetros físico-químicos operacionales y biológicos, este análisis consistió en el cálculo de los coeficientes de Pearson y de Spearman siendo el primero referente a correlaciones paramétricas y el segundo a una medida no paramétrica, por lo tanto no hace ninguna suposición a la distribución de las variables.

Seguidamente se realizó un análisis multivariante mediante la realización de un Análisis de Componentes Principales (ACP) para permitir la síntesis de la información contenida en una base de datos de gran dimensión en un nuevo subespacio de menor dimensión (Aguado, 2004)

A continuación se detallan cada uno de los métodos estadísticos realizados.

3.4.1 Coeficiente de correlación lineal de Pearson.

El coeficiente de correlación de Pearson se realiza para variables cuantitativas y es un índice de la precisión de la dependencia lineal entre variables linealmente relacionadas x e y (Viedma, 1972). Este coeficiente se calcula con la siguiente fórmula:

$$r = \frac{\sum(X_i - \bar{X}) \cdot (Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum(X_i - \bar{X})^2 \cdot (Y_i - \bar{Y})^2}}$$

\bar{X} : media de X.

\bar{Y} : media de Y.

El coeficiente de correlación de Pearson está comprendido entre -1 y +1, donde los valores próximos a +1 indican una fuerte dependencia lineal creciente y los valores de r próximos a -1 indican una dependencia lineal decreciente.

Los valores del coeficiente r pequeños indican una pequeña dependencia lineal. En estos casos se debe cambiar el modelo lineal por otro tipo de curva a fin de tener una mejor aproximación.

3.4.2 Coeficiente de Correlación de Spearman

El coeficiente de correlación de Spearman o por rangos, también llamado r_s es una medida no paramétrica de asociación que requiere que ambas variables sean aleatorias continuas, de forma que los objetos o individuos puedan colocarse en series ordenadas (Siegel, 1983).

El coeficiente de Spearman utiliza los números de orden (rangos) de cada grupo de variables y compara dichos rangos (Conover, 1998). Este coeficiente es recomendable utilizarlo cuando los datos presentan valores externos que afectan al coeficiente de Pearson o ante distribuciones no normales.

La fórmula para calcular el Coeficiente de Spearman es la siguiente:

$$r_s = 1 - \frac{6 \cdot \sum d_i^2}{N^3 - N}$$

donde:

d_i es la diferencia entre los rangos de X e Y, es decir $d_i = r_{X_i} - r_{Y_i}$.

N es el número de valores de la muestra

Los valores de los rangos se colocan según el orden numérico de los datos de la variable estudiada.

Su interpretación es semejante al coeficiente de correlación de Pearson. Para índices cercanos a +1 la asociación es positiva, para valores cercanos a -1 la asociación es negativa y 0 significa que no hay correlación entre las variables (Siegel, 1983).

3.4.3 Análisis de Componentes Principales (ACP)

El ACP es una técnica de reducción de la información disponible sobre un grupo de muestras, de los cuales se han tomado diversas variables sobre diversas características. Por ejemplo si se tienen datos de N muestras referentes a p características diferentes de éstos, es decir, $X=(X_1, \dots, X_p)$, el objetivo del ACP consiste en reducir las dimensiones de la variable X creando una nueva variable $U=(U_1, \dots, U_r)$, donde $r < p$, cuyas componentes U_i sean combinación lineal de las X_i y que también expliquen una proporción suficientemente grande de la dispersión total presente en los datos originales (Pérez, 1996).

El proceso de cálculo del ACP es el siguiente:

El primer componente se construye buscando un vector $b=(b_1, \dots, b_p)$ que, entre todos los que tengan modulo unitario, atribuya a U_1 la mayor varianza posible, de forma tal que este nuevo componente constituya la mejor explicación unidimensional de la varianza total en los datos (Pérez, 1996).

$$U_1 = b_{11} \cdot X_1 + b_{12} \cdot X_2 + \dots + b_{1p} \cdot X_p$$

Procediendo con las variables sucesivas se construyen las componentes principales. Este método logra sintetizar al máximo la información con el criterio de pérdida mínima de capacidad explicativa con respecto a la varianza de las series (Pérez, 1996).

Cuando se realiza un ACP sobre una matriz de datos X , se está realizando la siguiente modelación (Aguado, 2004):

$$X = \sum_{a=1}^A t_a \cdot p_a^T + E = \hat{X} + E$$

Donde, p_a son los vectores de pesos que definen las direcciones principales de máxima varianza en el espacio X . Estas direcciones determinan un subespacio de menor dimensión (A) que el espacio original.

La dimensión (A) se escoge de manera que no exista información importante de X en E que es la matriz de residuos, y que, por tanto, representa el ruido. \hat{X} es la estimación de X a partir de modelo con A componentes.

En la Figura 16 se muestran de forma gráfica las matrices del modelo ACP.

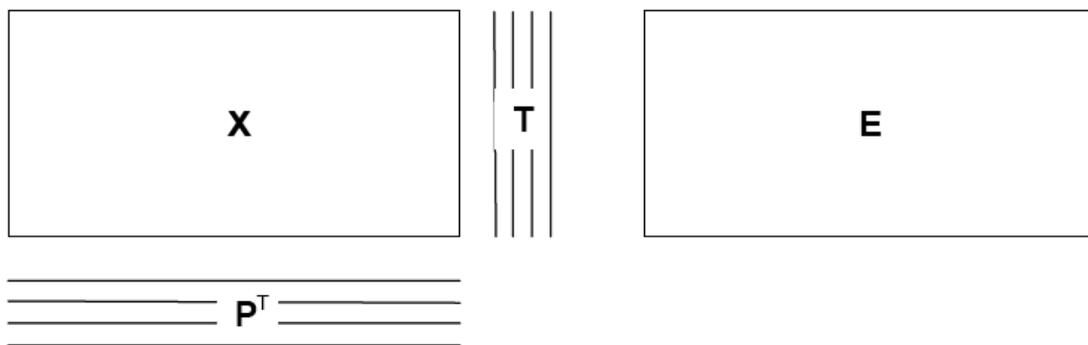


Figura 16. Representación esquemática de las matrices del modelo ACP.

Para una componente dada, los pesos son definidos como la dirección sobre la que se están proyectando las observaciones y están poniendo de manifiesto la contribución de las variables originales en la formación de dicha componente (Aguado, 2004).

3.4.4 Tratamiento por ordenador

Las correlaciones de Pearson y Spearman se obtuvieron mediante el programa Statgraphics Plus versión 5.1. En este programa se introdujo una matriz semejante a la Figura 15 con todos los parámetros a estudiar y se realizó un análisis estadístico correspondiente a las correlaciones de Pearson y Spearman.

El programa genera como salida de este estudio una gran tabla con los valores de las correlaciones y los p-valores de cada una. Estos últimos indican la bondad estadística del modelo

ajustado. Por ejemplo p-valores iguales o inferiores a 0,05 indican una relación estadísticamente significativa al 95%.

Para realizar el análisis de componentes principales (ACP) se utilizó el programa IBM SPSS Statistics 19 donde se introdujo la matriz de datos y se especificaron las variables para realizar el ACP.

El programa genera como salida tablas de: saturaciones en componentes, puntuaciones de objetos y varianza total explicada, así como también matrices de coeficientes para el cálculo de las puntuaciones en las componentes y de componentes.

Con estas tablas el programa genera los siguientes gráficos:

- Gráfico de Saturaciones en componentes: este gráfico representa las relaciones entre las variables, es decir, cuales variables son responsables de los patrones que presentan las muestras. En este gráfico cuando dos variables se encuentran muy cercanas entre si presentan correlaciones positivas entre sí, por el contrario si se encuentran linealmente opuestas presentan correlaciones negativas.
- Gráfico de Puntos de objetos etiquetados mediante número de caso: se refiere a la distribución de las muestras en las zonas del diagrama de la Dimensión 1- Dimensión 2 (o Componente 1 – Componente 2) mostrándose que los puntos que se encuentran próximos presentan valores parecidos de las variables que determinan dichas componentes.
- Diagrama de dispersión biespacial: contiene la información de los dos diagramas anteriores y viene siendo una superposición del gráfico de saturaciones en componentes y de los puntos de objetos, mostrando de forma clara los grupos de muestras que se encuentran relacionadas con ciertas variables debido a su cercanía en las zonas del gráfico.
- Gráfico de Sedimentación: se utiliza para determinar cuántos factores deben retenerse, tomándose en cuenta la cantidad de varianza (en porcentaje) explicada por dichos factores. Típicamente el gráfico muestra una fuerte ruptura entre la

pronunciada pendiente de los factores más significativos y el descenso gradual de los restantes, denominados sedimentos.

Para las variables físico-químicas, operacionales y los protozoos presentes se colocaron, en los resultados de este texto, los primeros tres diagramas nombrados anteriormente.

En el ACP realizado se utilizó una nomenclatura específica para cada una de las variables físico-químicas, operacionales y protistas. En las Tablas 13, 14 y 15 que se encuentran a continuación se muestran todas las variables con sus unidades y sus respectivas nomenclaturas para este análisis estadístico.

Tabla 13. Nomenclatura utilizada en el ACP para las variables físico-químicas.

	Variable	Unidades	Nomenclatura		Variable	Unidades	Nomenclatura
AFLUENTE	pH	ud	apH	LICOR MEZCLA	pH	ud	rpH
	Conductividad	μS/cm	aConduc		Conductividad	μS/cm	rConduc
	S.S.T	mg/L	aSST		SST	mg/L	rSS
	S.S.V	afI, mg/L	aSSV		SSV	mg/L	rSSV
	DQO total	mg/L	aDQOt		IVF real	ml/g	rIVF
	Caudal:DQO total	Kg/d	aQ_DQOt		N total	mg/L	rNt
	DQO soluble	mg/L	aDQOs		N total filtrado	mg/L	rNt_fil
	DBO	mg/L	aDBO		N total flóculo	mg/L	rNt_floc
	DBO filtrada	mg/L	aDBOf		P total	mg/L	rPt
	DQO/DBO	-	DQO_DBO		P total filtrado	mg/L	rPt_fil
	N total	mg/L	aNt		P total flóculo	mg/L	rPt_floc
	Caudal N total	Kg/d	aQ_Nt		DQO total	mg/L	r_DQOt
	N total soluble	mg/L	aNt_s		DQO filtrada	mg/L	rDQOt_fil
	N-NH ₄	mg/L	aNH4	T ^a	°C	rT	
	N-org soluble	mg/L	aNorg_s	S.S.T	mg/L	eSS	
	P total	mg/L	aPt	S.S.V	mg/L	eSSV	
	Caudal P total	Kg/d	aQ_Pt	D.Q.O	mg/L	eDQOt	
	P total soluble	mg/L	aPt_s	DQO soluble	mg/L	eDQO_s	
	P-PO ₄ (Fosfato)	mg/L	aPO4	D.B.O	mg/L	eDBO	
	P-org soluble	mg/L	aPorg_s	D.B.O filtrada	mg/L	eDBOfil	
	DBO/N/P	-	aDBO_N_P	DBO particulada	mg/L	eDBOpart	
	Sulfatos	mg/L	aSO4	Nitrógeno total	mg/L	eNt	
	Tens. aniónicos	mg/L	aTens	Nitrógeno total soluble	mg/L	eNt_s	
	Zn disuelto	mg/L	aZN	N-NH ₄	mg/L	eNH4	
	Ni disuelto	mg/L	aNi	N-NO ₂	mg/L	eNO2	

Tabla 13. Nomenclatura utilizada en el ACP para las variables físico-químicas. Continuación.

	Variable	Unidades	Nomenclatura		Variable	Unidades	Nomenclatura
RENDIMIENTO	Aldehídos	mg/L	aAld		N-NO ₃	mg/L	eNO3
	Fenoles	mg/L	aFen		N-org soluble	mg/L	eNorg_s
	Sulfitos	mg/L	aSO3		N-org particulado	mg/L	eNorg_p
	Cloruros	mg/L	aCl		Fósforo total	mg/L	ePt
	Eliminación de NKT	%	ElimNKT		Fósforo total soluble	mg/L	ePt_s
	Eliminación de NH ₄	%	ElimNH4		P-PO ₄	mg/L	ePO4
					NKTs	mg/L	eNKT
					Sulfatos	mg/L	eSO4
					Tens. aniónicos	mg/L	eTens

Tabla 14. Nomenclatura utilizada en el ACP para las variables operacionales.

Variable	Unidades	Nomenclatura
Caudal	m ³ /d	Caudal
TRH Dec primario	h	TRHprim
Carga Másica	Kg DBO ₅ /Kg SSVLM-d	CM
TRH reactor	h	TRHreac
Edad de Fango	días	EF
Oxígeno Disuelto <0,8 mg/L	mg/L	OD08
Oxígeno Disuelto	mg/L	OD
Temperatura reactor	°C	Treac
T.R.H Dec secundario	h	TRHsec

Tabla15. Nomenclatura utilizada en el ACP para las variables biológicas (protistas).

Variable	Unidades	Nomenclatura
Grandes Flagelados	ind/ml	GF
Amebas Testaceas	ind/ml	AT
Amebas grandes (>50 um)	ind/ml	AG
Amebas pequeñas (<50 um)	ind/ml	AP
Amebas Desnudas	ind/ml	AD
Total Amebas	ind/ml	TA
Nadadores Bacterívoros	ind/ml	NB
Nadadores Depredadores	ind/ml	ND
Total Nadadores	ind/ml	TN
Reptantes Bacterívoros	ind/ml	RB

Tabla 15. Nomenclatura utilizada en el ACP para las variables biológicas (protistas). Continuación.

Variable	Unidades	Nomenclatura
Reptantes Omnívoros	ind/ml	RO
Total Reptantes	ind/ml	TR
Sésiles Depredadores	ind/ml	SD
Sésiles Bacterívoros	ind/ml	SB
Total Sésiles	ind/ml	TS
Total Ciliados	ind/ml	TC

4. Resultados

Los resultados que se obtuvieron durante la realización del proyecto corresponden, tal como se explicó en el capítulo anterior, a la realización de las hibridaciones mediante la técnica FISH de 24 muestras tomadas quincenalmente en el fango activo de la depuradora de Quart Benáger, durante un período de un año. Las hibridaciones se realizaron con el fin de determinar y cuantificar la cantidad de bacterias nitrificantes del grupo de las amonio-oxidantes (AOB) y nitrito-oxidantes (NOB) presentes en el licor mezcla del reactor biológico.

Seguidamente se realizó un análisis cualitativo y cuantitativo de las bacterias hibridadas que dieron resultado positivo en las hibridaciones. Por último se realizó un análisis estadístico bivariante de Pearson y Spearman y un análisis de componentes principales (ACP) con los parámetros físico-químicos, operacionales y los grupos funcionales de protozoos presentes en el fango activo.

A continuación se presentan detalladamente los resultados obtenidos en el proyecto de investigación.

4.1. Toma de imágenes con señal de hibridación.

Una vez realizadas las 144 hibridaciones correspondientes a las seis sondas utilizadas en el presente trabajo, se procedió a la toma de fotos de aproximadamente 22 campos por cada pocillo de cada una de las sondas que dieron señal positiva en las hibridaciones.

Las sondas que dieron señal positiva fueron: Nso1225, Nmo218 y NEU para las AOB y la Ntspa662 para las NOB. Por otra parte las sondas que dieron señal negativa son: Nse1472 (AOB) y NIT3 (NOB) (Figura 13). A continuación se presentan algunas fotos tomadas para cada una de estas sondas.

La Figura 17 corresponde a un campo de la muestra número 4 hibridada con la sonda Nso1225, correspondiente al género *Nitrosomonas* spp. Se puede observar que estas bacterias forman agregados esféricos compactos, con células claramente visibles.

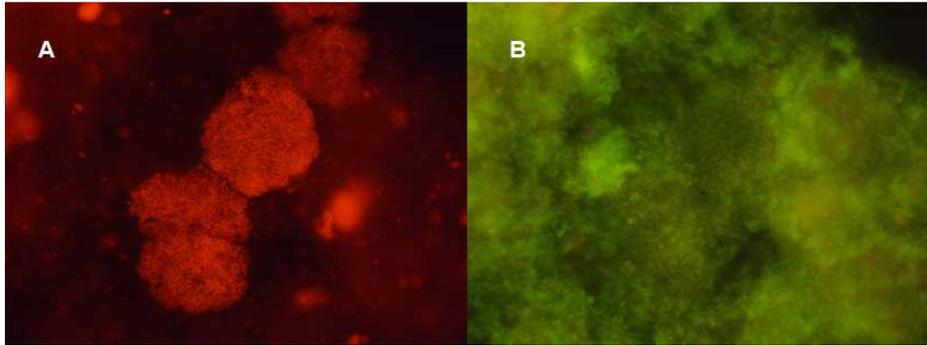


Figura 17. A) AOB sonda Nso 1225, B) Mismo campo sondas EUB338mix, 60x. Muestra 4.

En la Figura 18 se observa un campo correspondiente a la hibridación con la sonda Nmo218, la cual identifica las bacterias AOB del linaje *N. oligotropha*. En la figura 18A se presentan células muy visibles y compactas, pero agregados celulares de menor tamaño que los presentes en la Figura 17 correspondiente a la sonda Nso1225. Esto se debe a que *N. oligotropha* es una especie dentro del género *Nitrosomonas* y dentro de estos agregados de AOB estarían presentes otros género y especies de bacterias AOB.

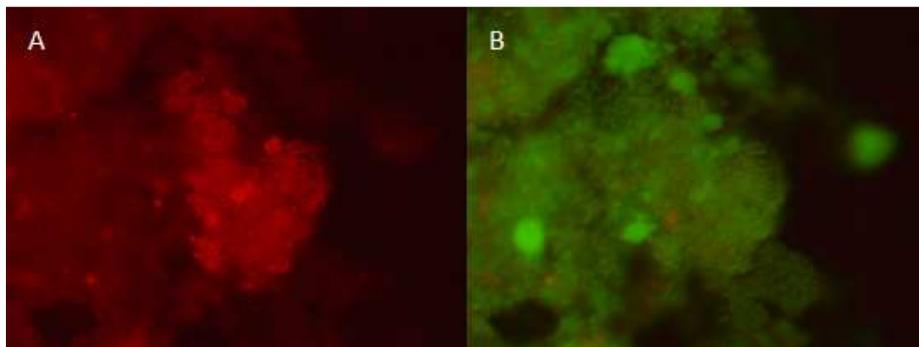


Figura 18. A) AOB, *N. oligotropha*. sonda Nmo 218, B) Mismo campo, EUB338mix, 60x. Muestra 4.

Por último, para el grupo de las AOB, se observaron bacterias identificadas con la sonda NEU, la cual identifica a los géneros: *N. halophila*, *N. europea*, *N. eutropha* y *Nitrosococcus mobilis*. En la Figura 19 se muestra un campo tomado con esta sonda donde se observa un agregado muy compacto de células, de menor tamaño y con una menor visibilidad que las sondas mostradas anteriormente.

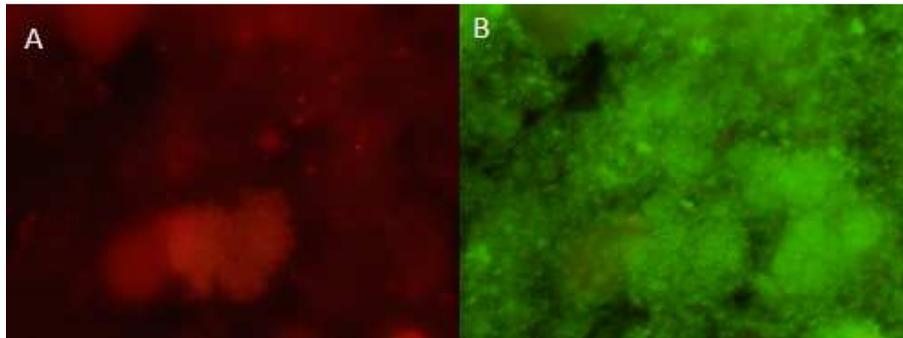


Figura 19. A) AOB, sonda NEU, B) Mismo campo, EUB338mix, 60x. Muestra 4.

Una vez realizadas las hibridaciones para la identificación de los géneros de *Nitrosomonas* (AOB) se procedió a la identificación de bacterias nitrato-oxidantes (NOB).

En la Figura 20 se muestra un campo visualizado con la sonda Ntspa662, correspondiente a las bacterias de la especie *Nitrospira* spp, donde se observa una presencia abundante de las mismas, formando agregados tanto esféricos como irregulares de menor diámetro que las AOB.

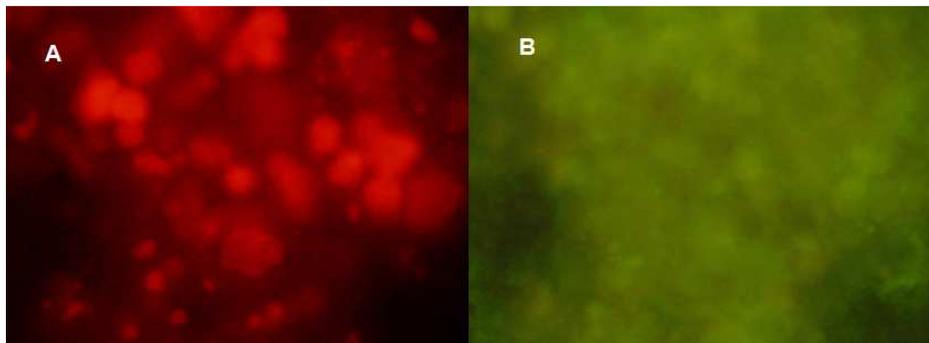


Figura 20. A) NOB, *Nitrospira* spp. sonda Ntspa 662, B) Mismo campo, EUB338mix, 60x. Muestra 4.

Es importante destacar que se realizaron aproximadamente 1056 fotos por cada sonda estudiada, correspondientes a 528 pares de fotos similares a las Figuras 17 a la 20.

Estas fotos son el resultado de capturar, en cada uno de los 24 pocillos que conforman el muestreo total del año, 22 campos aproximadamente por cada pocillo. Lo que quiere decir: 22 fotos del campo verde (bacterias generales) y 22 fotos del campo rojo (bacterias específicas).

4.2. Cuantificación de la señal de hibridación mediante el análisis de imagen.

Para la cuantificación de las bacterias nitrificantes presentes en cada muestra se utilizó el programa desarrollado por Borrás, (2008) tal como se indicó en el apartado de Materiales y Métodos. Este programa genera una hoja de cálculo en Excel, tal como se muestra en la Figura 21.

Este informe contiene los resultados de la cuantificación con las áreas ocupadas por las bacterias presentes para cada campo y para todo el pocillo.

En la hoja de cálculo generada también se presenta un gráfico de barras de porcentaje en área de las bacterias que desean identificarse en la muestra, junto con su media. En esta hoja las barras representan el porcentaje de bacterias específicas obtenido para cada campo y la línea azul es la media acumulada, la cual tiende a estabilizarse.

La Figura 21 corresponde al análisis de la muestra del día 11/03/2009 para la bacteria *N. oligotropha* (sonda Nmo218).

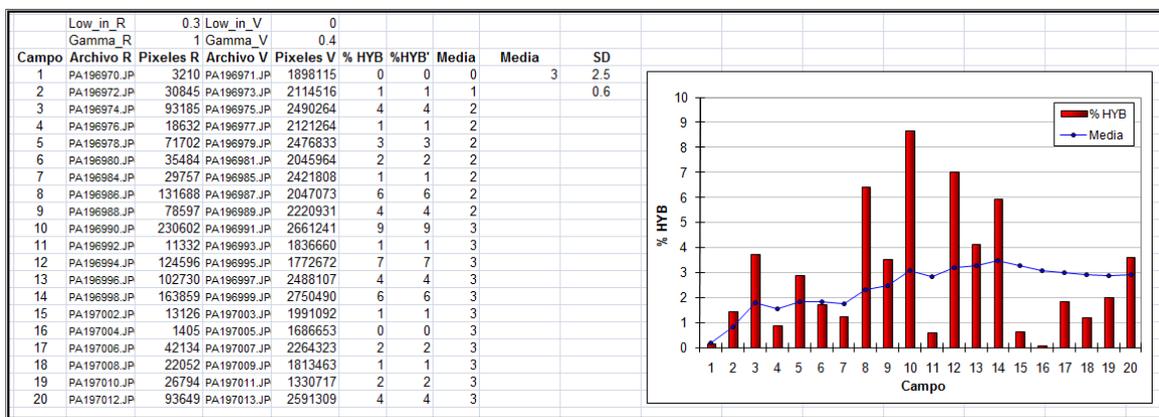


Figura 21. Hoja de cálculo generada por el programa de cuantificación de señal

En el presente trabajo se generaron 72 hojas de cálculo (correspondientes a 24 hojas en Excel para cada una de las sondas utilizadas: Nso 1225, Nmo 218 y Ntspa 662) semejantes a la Figura 21. De esta forma se obtuvieron los porcentajes en áreas de las bacterias nitrificantes presentes para cada muestra.

4.2.1 Análisis Cuantitativo

Una vez realizado el análisis de imagen de todos los pocillos mediante el programa de cuantificación se almacenó el porcentaje final por fecha de muestreo en tablas. La media de las bacterias se presenta tanto en porcentaje (%) como en miligramos de sólidos suspendidos volátiles en el licor mezcla por litro (mgSSVLM/L).

A continuación se presenta la Tabla 16 correspondiente a las AOB identificadas mediante las sondas Nso1225 y Nmo218. Cabe destacar que la sonda Nso1225 contiene a la sonda Nmo218, tal como se mostró anteriormente en la Figura 13.

Tabla 16. Promedio de las áreas en pixeles ocupadas por las *Nitrosomonas* (Nso1225) y las *N. oligotropha* (Nmo218) con su error respectivo.

Fecha de Muestreo	Nso 1225			Nmo 218		
	Media (promedio del área %)	Media (mgSSVLM/l)	Error (%)	Media (promedio del área %)	Media (mgSSVLM/l)	Error (%)
04/12/2008	4	78,8	1	4	78,8	1
17/12/2008	3	50,7	1	2	33,8	<1
14/01/2009	3	60,4	1	2	40,3	<1
28/01/2009	6	102,3	1	5	85,2	1
11/02/2009	6	95,4	1	5	79,5	1
25/02/2009	3	43,95	<1	3	43,9	<1
11/03/2009	4	58,2	1	3	43,6	<1
25/03/2009	1	18,8	1	1	18,8	<1
07/04/2009	2	42	1	2	42	<1
22/04/2009	5	101	1	4	80,8	<1
06/05/2009	1	15,6	<1	1	15,6	<1
20/05/2009	4	97,2	1	4	97,2	<1
03/06/2009	6	132,6	1	2	44,2	<1
17/06/2009	6	149,4	1	4	99,6	1
01/07/2009	6	115,2	1	3	57,6	<1
15/07/2009	6	137,7	1	1	22,9	<1
09/09/2009	6	101,4	1	3	50,7	1
23/09/2009	3	57	<1	1	19	<1
07/10/2009	1	19,2	<1	1	19,2	<1
21/10/2009	1	20,7	<1	1	20,7	<1
04/11/2009	6	109,2	1	5	91	1
18/11/2009	6	123	1	4	82	<1
16/12/2009	5	83	1	4	66,4	1
29/12/2009	3	68,1	<1	3	68,1	<1

En la Tabla 16 se observa que los promedios de *Nitrosomonas* (Nso1225) van desde un 1% a un 6% y que *N. oligotropha* (Nmo218) van desde un 1% a un 5%.

Existe una dinámica poblacional entre los distintos grupos de AOB presentes. Esto puede observarse debido a que en algunos muestreos (9 en total) la totalidad de las AOB son de la especie *N. oligotropha* (igual porcentaje que las *Nitrosomonas*). Sin embargo hay muestras donde existe mucha diferencia entre ambos porcentajes de bacterias; tal es el caso del día 15/07/2009 donde las *Nitrosomonas* representan un 6% de la población total de bacterias, en cambio *N. oligotropha* representa tan solo un 1%.

Debido a estos cambios poblacionales puede concluirse que a pesar de existir una clara población de AOB que efectúa el proceso de oxidación del amonio, esta población es dinámica y cambia su composición y distribución de las especies.

En la Tabla 17 se observan los resultados de la cuantificación de las NOB para el género *Nitrospira* identificada con la sonda Ntspa662.

Tabla 17. Promedio de las áreas en pixeles ocupadas por las bacterias *Nitrospira* spp y su error respectivo.

Fecha de Muestreo	Ntspa 662		
	Media (promedio del area %)	Media (mgSSVLM/L)	Error (%)
04/12/2008	3	59,1	1
17/12/2008	2	33,8	1
14/01/2009	1	20,2	1
28/01/2009	4	68,2	2
11/02/2009	2	31,8	1
25/02/2009	1	14,7	1
11/03/2009	<1	1,5	0
25/03/2009	1	18,8	1
07/04/2009	1	21,0	1
22/04/2009	1	20,2	1
06/05/2009	<1	6,3	1
20/05/2009	1	24,3	1
03/06/2009	1	22,1	1
17/06/2009	1	24,9	1
01/07/2009	1	19,2	1
15/07/2009	2	45,9	1

Tabla 17. Promedio de las áreas en pixeles ocupadas por las bacterias *Nitrospira* spp y su error respectivo.
Continuación.

Fecha de Muestreo	Ntspa 662		
	Media (promedio del area %)	Media (mgSSVLM/L)	Error (%)
09/09/2009	2	33,8	1
23/09/2009	3	57,0	1
07/10/2009	1	19,2	1
21/10/2009	1	20,7	1
04/11/2009	1	18,2	1
18/11/2009	4	82,0	1
16/12/2009	1	16,6	1
29/12/2009	3	68,1	1

En la Tabla 17 se muestra que las NOB tienen porcentajes menores a las AOB, estos porcentajes van desde una cantidad inferior al 1% a un 4%.

Es importante destacar que en este estudio se ha multiplicado el porcentaje en área ocupados por las bacterias nitrificantes por la concentración de los sólidos suspendidos volátiles en el licor mezcla, para así obtener una variable continua acorde a la cantidad real de bacterias existentes en el sistema

Seguidamente se muestra la Tabla 18, correspondiente a las observaciones de las muestras hibridadas con la sonda NEU. Esta sonda identifica los géneros de bacterias AOB siguientes: *N. halophila*, *N. europaea*, *N. eutropha* y *Nitrosococcus mobilis* (Véase la Figura 13).

Debido a que al realizar el barrido previo a la cuantificación se observó un cantidad muy pequeña de bacterias marcadas por la sonda NEU, incluso en algunos pocillos la cantidad era nula; únicamente se realizó un análisis cualitativo, donde se indica por fecha de muestreo si hay presencia de bacterias (positivo) o si no se observaron comunidades de bacterias (negativo).

Tabla 18. Observaciones de las comunidades bacterianas hibridadas por la sonda NEU.

Fecha de Muestreo	NEU
	Media (promedio del área %)
04/12/2008	Positivo ^a
17/12/2008	Positivo
14/01/2009	Positivo
28/01/2009	Positivo
11/02/2009	Negativo
25/02/2009	Negativo
11/03/2009	Positivo
25/03/2009	Positivo
07/04/2009	Positivo
22/04/2009	Positivo
06/05/2009	Positivo
20/05/2009	Positivo
03/06/2009	Positivo
17/06/2009	Positivo
01/07/2009	Negativo
15/07/2009	Positivo
09/09/2009	Negativo
23/09/2009	Negativo
07/10/2009	Negativo
21/10/2009	Negativo
04/11/2009	Negativo
18/11/2009	Positivo
16/12/2009	Positivo
29/12/2009	Positivo

^a positivo: menor del 1%

También se realizaron hibridaciones que arrojaron resultados negativos, es decir que no había presencia de este tipo de comunidad bacteriana en el licor mezcla. A continuación se indican dichas sondas y las bacterias que permiten identificar:

- Sonda de AOB:
 - Nse1472, hibrida a los géneros: *Nitrosomona europaea*, *Nitrosomona eutropha* y *Nitrosomona halophila*.
- Sondas de NOB:
 - NIT3, hibrida al género *Nitrobacter*.

4.3. Análisis Estadístico entre las señales obtenidas para las bacterias AOB y NOB y los parámetros operacionales de la EDAR

El Análisis Estadístico realizado para relacionar la población de bacterias nitrificantes con los parámetros físico-químicos, operacionales y biológicos (protistas en el licor mezcla) se dividió en dos partes: primero un análisis bivariante donde se determinaron los coeficientes de Pearson y Spearman y segundo un análisis multivariante, correspondiente a un ACP.

Antes de hacer dichos análisis se realizó un resumen estadístico de todos los parámetros determinados durante el período de diciembre 2008 a diciembre 2009 en la EDAR de Quart Benager. En estos resúmenes se presenta el mínimo, el máximo y la desviación estándar de cada una de las variables.

A continuación se presentan las Tablas 19, 20 y 21 correspondientes al resumen estadístico de las variables físico-químicas, operacionales y de los protozoos respectivamente.

4.3.1 Resumen Estadístico de las variables físico-químicas, operacionales y protistas.

Tabla 19. Resumen Estadístico de las variables físico-químicas.

	Características	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Estándar
AFLUENTE	pH, ud	7,59	8,08	7,80	0,13
	Conductividad, $\mu\text{S}/\text{cm}$	1920	2760	2269	271
	S.S.T, mg/L	70	170	113	32
	S.S.V, mg/L	68	146	91	25
	DQO total, mg/L	210	676	378	157
	Caudal-DQO total, Kg/d	8097	20251	13302	3879
	DQO soluble, mg/L	102	356	201	88
	DBO, mg/L	90	420	216	108
	DBO filtrada, mg/L	50	250	127	72
	DQO/DBO	1,61	2,33	1,82	0,23
	N total, mg/L	31,5	74,0	46,3	15,0
	Caudal-Nt, Kg/d	1191	2224	1641	344
	N total soluble, mg/L	24,0	65,0	38,6	13,8
	N-NH ₄ , mg/L	24,0	58,0	34,7	11,5
	N-org soluble, mg/L	0	8,90	3,84	3,29
N-org particulado coloidal, mg/L	1,0	15,0	8,0	3,6	

Tabla 19. Resumen Estadístico de las variables físico-químicas. Continuación.

	Características	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Estándar
AFLUENTE	P total, mg/L	3,10	8,40	4,58	1,72
	Caudal·Ptotal, Kg/d	114	245	162	41
	P total soluble, mg/L	1,0	5,0	2,4	1,2
	P-PO ₄ (Fosfatos), mg/L	1,0	4,8	2,2	1,2
	P-org soluble, mg/L	0	0,30	0,18	0,09
	DBO/N/P	0,68	1,48	1,04	0,28
	Sulfatos, mg/L	176,0	260,0	216,8	24,6
	Tens. aniónicos, mg/L	1,26	7,50	3,04	1,83
	Zn disuelto, mg/L	0,21	3,66	2,32	1,37
	Ni disuelto, mg/L	0,025	0,400	0,100	0,100
	Aldehídos, mg/L	0,05	0,56	0,29	0,15
	Fenoles, mg/L	0,37	1,38	0,68	0,34
	Sulfitos, mg/L	0,5	2,8	1,2	0,9
	Cloruros, mg/L	133	465	320	85
LICOR MEZCLA	pH, ud	7,23	7,79	7,45	0,17
	Conductividad, µS/cm	1330	2560	1876	364
	SST, mg/L	1805	3120	2517	340
	SSV, mg/L	1455	2490	1974	300
	IVF real, ml/g	59	162	11	32
	N total, mg/L	94	186	132	34
	N total filtrado, mg/L	3,6	34	11	10
	N total flóculo, mg/L	87	172	121	30
	P total, mg/L	36	74	59	11
	P total filtrado mg/L	0	1,30	0,39	0,41
	P total flóculo, mg/L	36	74	59	11
	DQO total, mg/L	2236	3318	2814	324
	DQO filtrada, mg/L	39	60	52	7
	DQO, mg/L	2189	3266	2762	324
T ^a , °C	14	27	22	4	
EFLUENTE	SST, mg/L	6	40	14	2
	SSV, mg/L	4	34	10	2
	DQO, mg/L	41	125	40	15
	DQO soluble, mg/L	34	60	35	8
	DBO, mg/L	4	22	10	4
	DBO filtrada, mg/L	2	17	6	4
	DBO particulada, mg/L	1	18	8	7
	Nitrógeno total, mg/L	6,5	48,0	17,4	12,4
	Nitrógeno total soluble, mg/L	5,6	42,5	15,3	11,3
	N-NH ₄ , mg/L	0,10	32,60	7,75	10,42
	N-NO ₂ , mg/L	0,04	2,02	0,68	0,62

Tabla19. Resumen Estadístico de las variables físico-químicas. Continuación.

	Características	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Estándar
EFLUENTE	N-NO ₃ , mg/L	0,36	9,40	5,06	2,56
	N-org soluble, mg/L	0	4,10	1,76	1,23
	N-org particulado, mg/L	0	8	2	3
	Fósforo total, mg/L	0,20	2,70	1,23	1,00
	Fósforo total soluble, mg/L	0	2,1	0,43	0,61
	P-PO ₄ , mg/L	0	1,9	0,4	0,6
	P-org soluble, mg/L	0	0,20	0,08	0,09
	P-org particulado, mg/L	0	2,60	0,80	0,98
	NKTs, mg/L	1	36	10	11
	Sulfatos, mg/L	110	254	224	40
	Tens. aniónicos, mg/L	0,08	1,54	0,41	0,42

Tabla 20. Resumen Estadístico de las variables operacionales.

Característica	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Estándar
Caudal, m ³ /d	28966	44562	35238	4825
TRH (Dec prim), h	3,9	6,5	5,1	0,8
CM, Kg DBO5/kg SSVLM-d	0,08	0,47	0,21	0,09
TRHreactor, h	13,5	21,9	16,83	1,74
EF, días	4,6	28	11	6
Oxígeno Disuelto <0,8 mg/L	0,04	0,56	0,27	0,15
Oxígeno Disuelto, mg/L	1,02	1,60	1,23	0,10
T reactor, °C	14,4	28,5	21,4	3,7
T,R.H secundarios, horas	5	9,2	6,8	1,2

Tabla 21. Resumen Estadístico de los protozoos.

Variable	Mínimo [indiv/ml]	Máximo [indiv/ml]	Media [indiv/ml]	Desviación Estándar [indiv/ml]
Total Grandes Flagelados	0	4027	667	955
Total Amebas Testáceas	0	28533	1739	5770
Amebas grandes (>50 um)	0	5480	3763	3625
Amebas pequeñas (<50 um)	380	13420	3763	3625
Total Amebas Desnudas	2060	14140	5668	3476
Total Amebas	2080	32880	7407	6528
Nadadores bacterívoros	0	5080	545	1111
Nadadores depredadores	0	2380	299	545

Tabla 21. Resumen Estadístico de los protozoos. Continuación.

Variable	Mínimo [indiv/ml]	Máximo [indiv/ml]	Media [indiv/ml]	Desviación Estándar [indiv/ml]
Total Nadadores	0	5960	844	1379
Reptantes bacterívoros	140	9160	2442	2839
Reptantes omnívoros	0	8580	1630	2202
Total Reptantes	140	13280	4073	3991
Sésiles depredadores	0	1101	145	217
Sésiles bacterívoros	540	13360	4821	3164
Total Sésiles	660	13440	4966	3121
Total Ciliados	2080	20693	9883	4997

4.3.1 Coeficientes de Pearson y Spearman. Análisis Bivariante.

El Análisis bivariante se realizó en la plataforma de Statgraphics Plus versión 5.1, introduciendo las variables físico-químicas, operacionales y los protistas presentes en el licor mezcla. En todas las tablas correspondientes al análisis de Pearson y Spearman se presentan algunos valores en negrita, esto indica una significancia estadística de un nivel igual o superior al 95%.

A continuación se presenta la Tabla 22 donde se observan los coeficientes de Pearson y Spearman para las variables físico-químicas del proceso con respecto a las bacterias nitrificantes presentes.

Tabla 22. Correlaciones de Pearson y Spearman entre las AOB (*Nitrosomonas* y *N. oligotropha*) y la NOB (*Nitrospira*) con las variables físico-químicas del proceso.

		Coeficientes de Correlación de Pearson			Coeficientes de Correlación de Spearman		
		<i>Nitrosomonas</i>	<i>N. oligotropha</i>	<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrosomonas</i>	<i>N. oligotropha</i>	<i>Nitrospira</i>
AFLUENTE	Variable						
	pH	-0,184	0,011	-0,077	-0,172	0,092	0,121
	Conductividad	-0,334	-0,243	0,082	-0,323	-0,238	0,153
	S.S.T	-0,434	-0,177	-0,113	-0,477	-0,172	-0,038
	S.S.V	-0,465	-0,207	-0,115	-0,483	-0,219	0,007
	DQO total	-0,578	-0,408	-0,314	-0,622	-0,392	-0,190
	Caudal-DQOt	-0,615	-0,491	-0,423	-0,640	-0,446	-0,280
	DQO soluble	-0,681	-0,545	-0,398	-0,764	-0,549	-0,314
DBO	-0,487	-0,413	-0,431	-0,487	-0,413	-0,431	

Tabla 22. Correlaciones de Pearson y Spearman entre las AOB (*Nitrosomonas* y *N. oligotropha*) y la NOB (*Nitrospira*) con las variables físico-químicas del proceso. Continuación.

Variable	Coeficientes de Correlación de Pearson			Coeficientes de Correlación de Spearman		
	<i>Nitrosomonas</i>	<i>N. oligotropha</i>	<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrosomonas</i>	<i>N. oligotropha</i>	<i>Nitrospira</i>
DBO filtrada	-0,352	-0,314	-0,406	-0,352	-0,314	-0,406
DQO/DBO	0,402	0,172	0,426	0,402	0,172	0,426
N total	-0,481	-0,257	-0,097	-0,547	-0,325	-0,033
Caudal-N total	-0,582	-0,387	-0,239	-0,618	-0,404	-0,160
N total soluble	-0,524	-0,272	-0,088	-0,573	-0,339	-0,016
N-NH ₄	-0,532	-0,323	-0,115	-0,556	-0,354	-0,049
N-org soluble	-0,349	-0,235	-0,506	-0,395	-0,235	-0,506
N-org particulada coloidal	-0,045	-0,075	-0,094	-0,131	-0,039	0,132
P total	-0,440	-0,183	0,133	-0,489	-0,206	0,102
Caudal-P total	-0,502	-0,247	0,106	-0,578	-0,274	0,031
P total soluble	-0,552	-0,249	0,070	-0,569	-0,259	0,032
P-PO ₄	-0,641	-0,584	-0,327	-0,647	-0,597	-0,233
P-org soluble	-0,407	-0,307	-0,363	-0,424	-0,239	-0,080
DBO/N/P	0,199	0,287	-0,047	0,246	0,464	0,137
Sulfatos	-0,061	-0,164	0,112	0,014	-0,173	0,290
T. aniónicos	-0,412	-0,357	-0,111	-0,346	-0,283	-0,043
Zn disuelto	0,336	0,131	0,067	0,388	0,185	-0,077
Ni disuelto	-0,314	-0,187	0,035	-0,279	-0,217	0,098
Aldehídos	-0,592	-0,637	-0,236	-0,592	-0,637	-0,236
Fenoles	0,015	-0,072	-0,296	0,015	-0,072	-0,296
Sulfitos	0,558	0,698	-0,085	0,558	0,698	-0,085
Cloruros	-0,635	-0,418	-0,173	-0,635	-0,418	-0,173
pH	-0,426	-0,255	-0,161	-0,394	-0,222	-0,144
Conductividad	-0,444	-0,318	-0,147	-0,442	-0,333	-0,007
S.S.T	0,490	0,329	0,365	0,486	0,340	0,498
SSV	0,418	0,278	0,316	0,385	0,257	0,554
IVF real	-0,187	0,193	-0,273	-0,259	0,123	-0,282
N total	-0,097	-0,126	-0,049	-0,144	-0,170	0,181
N total filtrado	-0,495	-0,514	-0,284	-0,462	-0,508	-0,232
N total flóculo	0,049	0,022	0,035	0,012	0,010	0,252
P total	0,579	0,362	0,433	0,568	0,276	0,380
P total filtrado	-0,054	0,042	0,214	0,050	0,156	0,150
P total flóculo	0,566	0,346	0,392	0,545	0,237	0,316

Tabla 22. Correlaciones de Pearson y Spearman entre las AOB (*Nitrosomonas* y *N.oligotropha*) y la NOB (*Nitrospira*) con las variables físico-químicas del proceso. Continuación.

	Variable	Coeficientes de Correlación de Pearson			Coeficientes de Correlación de Spearman		
		<i>Nitrosomonas</i>	<i>N. oligotropha</i>	<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrosomonasa</i>	<i>N.oligotropha</i>	<i>Nitrospira</i>
LM	DQO total	0,208	0,281	0,225	0,208	0,281	0,225
	DQO filtrada	-0,132	-0,073	-0,076	-0,001	0,038	-0,110
	Tª reactor	0,283	-0,153	-0,156	0,223	-0,073	-0,142
EFLUENTE	S.S.T	-0,005	0,086	0,048	-0,141	0,032	0,104
	S.S.V	0,143	0,293	-0,148	0,143	0,293	-0,148
	D.Q.O total	-0,097	-0,001	0,049	-0,281	-0,031	0,077
	DQO soluble	-0,366	-0,364	-0,330	-0,454	-0,409	-0,338
	D.B.O	0,009	0,200	-0,210	0,009	0,200	-0,210
	D.B.O filtrada	-0,510	-0,441	-0,270	-0,510	-0,441	-0,270
	DBO particulada	0,158	0,335	-0,138	0,158	0,335	-0,138
	N total	-0,603	-0,463	-0,044	-0,621	-0,498	0,033
	N total soluble	-0,720	-0,548	-0,161	-0,753	-0,607	-0,077
	N-NH ₄	-0,789	-0,692	-0,288	-0,820	-0,781	-0,241
	N-NO ₂	-0,056	0,023	0,149	-0,277	-0,257	0,096
	N-NO ₃	0,037	0,239	0,264	0,026	0,209	0,242
	N-org soluble	-0,401	-0,100	0,054	-0,444	-0,113	0,033
	N-org particulado	0,038	0,016	0,265	-0,042	-0,064	0,318
	P total	-0,220	-0,159	0,024	-0,306	-0,220	0,035
	P total soluble	-0,402	-0,326	-0,086	-0,318	-0,339	0,012
	P-PO ₄	-0,399	-0,310	-0,093	-0,315	-0,329	-0,047
	P-org soluble	-0,120	-0,262	0,058	-0,103	-0,247	0,181
	P-org particulado	-0,021	0,004	0,074	-0,071	-0,071	0,085
	NKT	-0,792	-0,665	-0,266	-0,805	-0,757	-0,193
Sulfatos	0,017	-0,026	0,091	0,030	-0,033	0,359	
Tens. aniónicos	-0,341	-0,311	-0,133	0,020	0,020	0,176	

En la Tabla 22 se observan correlaciones negativas significativas entre todos los parámetros referentes a la DQO, al Nitrógeno (N) y al Fósforo (P) en el afluente y las bacterias nitrificantes. Esto podría deberse a que cuando entra más materia orgánica a la EDAR también entra más cantidad de nitrógeno y fósforo; y al aumentar la materia orgánica en la entrada del reactor, existirá un mayor consumo de la misma por parte de las bacterias heterótrofas

Las bacterias heterótrofas son fuertes competidoras por el oxígeno disuelto con las bacterias nitrificantes, por lo tanto al aumentar todos estos compuestos mencionados en el afluente, se ha visto que disminuye el OD presente en el licor mezcla y es por ello que también se ve afectado el crecimiento poblacional de las bacterias nitrificantes.

Otros resultados interesantes son las correlaciones negativas significativas entre los tensioactivos aniónicos y los cloruros en el afluente con las AOB. Por lo tanto, estos compuestos podrían estar actuando como inhibidores de la nitrificación.

Seguidamente se muestra la Tabla 23, correspondiente al análisis bivariante de las variables operacionales con respecto a las bacterias nitrificantes estudiadas.

Tabla 23. Correlaciones de Pearson y Spearman entre las AOB (*Nitrosomonas* y *N. oligotropha*) y la NOB (*Nitrospira*) con las variables operacionales del proceso.

Variable	Coeficientes de Correlación de Pearson			Coeficientes de Correlación de Spearman		
	<i>Nitrosomonas</i>	<i>N. oligotropha</i>	<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrosomonas</i>	<i>N. oligotropha</i>	<i>Nitrospira</i>
Caudal	0,301	-0,083	-0,138	0,263	-0,024	-0,089
TRH (Dec prim)	-0,300	-0,280	-0,011	-0,275	-0,360	0,059
Carga Másica	-0,577	-0,449	-0,394	-0,594	-0,360	-0,268
TRHreactor	0,099	0,365	0,322	0,167	0,342	0,139
Edad de Fango	0,217	0,460	0,019	0,320	0,422	0,128
Oxígeno Disuelto >0,8 mg/L	0,229	-0,069	0,051	0,232	-0,041	0,161
Oxígeno Disuelto (mg/L)	-0,206	-0,037	-0,141	-0,171	0,079	-0,216
T° reactor	0,313	-0,214	-0,095	0,299	-0,142	-0,034
T.R.H secundarios	0,037	0,121	-0,270	-0,013	0,047	-0,207

En la Tabla 23 se destacan las correlaciones negativas significativas tanto de Pearson como de Spearman de las AOB con respecto a la carga másica. Por lo tanto la nitrificación se ve favorecida cuando este parámetro tiene valores bajos. Por el contrario, con la edad de fango, las correlaciones son positivas, es decir que a mayor tiempo de retención celular se verá favorecida la actividad de las bacterias nitrificantes.

Por último se presentan, en la Tabla 24, los coeficientes de Pearson y Spearman obtenidos en el análisis de los protistas presentes en el licor mezcla y las bacterias nitrificantes identificadas.

Tabla 24. Correlaciones de Pearson y Spearman entre las AOB (*Nitrosomonas* y *N. oligotropha*) y la NOB (*Nitrospira*) con los grupos de protozoos presentes en el licor mezcla.

Variable	Coeficientes de Correlación de Pearson			Coeficientes de Correlación de Spearman		
	<i>Nitrosomonas</i>	<i>N. oligotropha</i>	<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrosomonas</i>	<i>N. oligotropha</i>	<i>Nitrospira</i>
Total Grandes Flagelados	-0,307	-0,237	0,086	0,107	0,018	0,349
Total Amebas testáceas	-0,281	-0,201	-0,115	-0,190	0,102	-0,194
Amebas grandes (>50 um)	0,132	0,215	0,234	0,111	0,187	0,557
Amebas pequeñas (<50 um)	-0,248	-0,116	-0,120	-0,170	-0,078	-0,209
Total Amebas desnudas	-0,203	-0,030	-0,026	-0,124	0,043	-0,041
Total Amebas	-0,357	-0,193	-0,115	-0,161	0,033	-0,093
.Nadadores bacterívoros	-0,189	-0,059	0,087	-0,122	0,078	0,066
Nadadores depredadores	0,152	0,101	0,215	0,101	0,198	0,405
Total Nadadores	-0,092	-0,008	0,155	0,078	0,285	0,317
Reptantes bacterívoros	0,079	0,354	0,293	0,074	0,403	0,065
Reptantes omnívoros	0,039	0,398	0,133	0,139	0,456	0,182
Total Reptantes	0,078	0,472	0,282	0,156	0,568	0,206
Sésiles depredadores	0,052	0,378	-0,004	-0,121	0,240	0,282
Sésiles bacterívoros	0,315	-0,106	0,263	0,338	-0,017	0,267
Total Sésiles	0,323	-0,082	0,266	0,348	0,017	0,300
Total Ciliados	0,238	0,324	0,434	0,305	0,357	0,438

De la Tabla 24 se pueden extraer correlaciones importantes entre distintos grupos de protozoos y las bacterias nitrificantes. Tal es el caso de los reptantes totales con las *N. oligotropha*, donde se presentan correlaciones positivas, pudiendo ser estos bioindicadores del proceso de nitrificación.

Por otra parte se obtuvo una correlación significativa de Spearman positiva entre las amebas grandes y las NOB (*Nitrospira*) ($r_s=0,557$; $p<0,05$), lo que supone que dichos protistas pueden ser principalmente depredadores de estas bacterias. Esto se debe a que las amebas grandes son capaces de consumir agregados bacterianos que se encuentran en el licor mezcla. Si las condiciones del fango activo favorecen al tipo de alimentación de estos protistas, la población de amebas grandes crecerá al aumentar la cantidad de agregados bacterianos que puedan ser consumidos por las mismas.

Por último se muestra la Tabla 25, correspondiente a las correlaciones de Pearson y Spearman de las bacterias nitrificantes estudiadas entre ellas mismas. Esta tabla también contiene las correlaciones de las bacterias estudiadas con respecto a la eliminación del amonio y del Nitrógeno Total *Kjeldahl* (NKT).

Tabla 25. Correlaciones de Pearson y Spearman entre las AOB (*Nitrosomonas* y *N.oligotropha*) y la NOB (*Nitrospira*) y con estas bacterias con respecto al Rendimiento del proceso de nitrificación.

Variable	Coeficientes de Correlación de Pearson			Coeficientes de Correlación de Spearman		
	<i>Nitrosomonas</i>	<i>N. oligotropha</i>	<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrosomonas</i>	<i>N. oligotropha</i>	<i>Nitrospira</i>
<i>Nitrosomonas</i>	1	0,73	0,406	1	0,756	0,461
<i>N. oligotropha</i>	0,73	1	0,377	0,756	1	0,388
<i>Nitrospira</i>	0,406	0,377	1	0,461	0,388	1
Eliminación de NH ₄	0,813	0,6578	0,322	0,786	0,658	0,322
Eliminación de NKT	0,817	0,619	0,333	0,727	0,597	0,335

Según los datos obtenidos en la Tabla 25 se puede observar una fuerte correlación positiva entre las AOB (sondas Nso1225 y Nmo218), lo que quiere decir una clara dependencia entre estas poblaciones; ya que las *N.oligotropha* representan, en una gran cantidad de muestreos, un amplio porcentaje del total de las *Nitrosomonas* (Véase la Tabla 16).

Por otra parte, las bacterias nitrificantes tienen una fuerte relación con el rendimiento del proceso. Esto tiene suma importancia debido a que demuestra la robustez de la técnica de cuantificación FISH, debido a que al aumentar la cantidad de bacterias nitrificantes en el proceso necesariamente debe aumentar el rendimiento de la nitrificación, tal como demuestran los resultados obtenidos.

4.3.2 Análisis de Componentes Principales (ACP).

En el presente estudio se realizaron tres ACP: primero para las variables físico-químicas, otro para las variables operacionales y un tercero para los protistas presentes en el licor mezcla. Los resultados mostrados en este apartado corresponden a los diagramas de dispersión biespacial para las variables físico-químicas, operacionales y para los protistas.

Como se mencionó en el apartado 3.4.4, el gráfico de dispersión biespacial es la superposición del gráfico de saturaciones en componentes y del gráfico de puntos de objetos. Para mayor comodidad en la interpretación del ACP se muestran estos dos últimos gráficos por separado para las variables físico-químicas, debido a la gran cantidad de las mismas (Figuras 22 y 23).

Es importante la comprensión de estos gráficos para su correcta interpretación, para ello se debe saber que los mismos están divididos en dos ejes (Dimension 1 y Dimension 2) que representan las dos dimensiones (o componentes) que explican la mayor varianza acumulada.

Estos gráficos tienen cuatro cuadrantes, en ellos se reparten distintos grupos de variables representadas por vectores. Estas variables, mientras más cercanas se encuentran entre sí, se verán fuertemente relacionadas. Por el contrario, si hay un grupo de variables que aparecen en el cuadrante opuesto (respecto al origen de coordenadas), es decir que siguiendo una misma línea se encuentran en los extremos de la misma pasando por el centro del gráfico, entonces estos grupos de variables presentarán una relación inversa.

En los gráficos de dispersión biespacial y en el de puntos de objetos etiquetados se encuentran pequeños círculos que representan las 24 muestras tomadas durante un año. Dependiendo de la ubicación de estas muestras en el gráfico se verán relacionadas con ciertos grupos de variables. Por ejemplo si la muestra 1 se encuentra en el mismo cuadrante que la variable X, esta cercanía querrá decir que en dicha muestra se tiene una cantidad significativa de la variable X.

La nomenclatura utilizada para el ACP se encuentra en las Tablas 13, 14 y 15, que se encuentra en el apartado 3.4.4 del presente trabajo.

En la Figura 22 se observan las saturaciones en componentes del estudio con los parámetros físico-químicos, donde se tiene que las AOB y las NOB se encuentran cercanas y relacionadas entre sí, tal como se encuentra señalado en el gráfico. De igual forma los SSV presentes en el reactor (rSSV) también se relacionan fuertemente con los grupos de bacterias debido a que estas bacterias representan un porcentaje de estos SSV, los cuales son considerados como la totalidad de las bacterias presentes en el licor mezcla.

Cabe resaltar que la eliminación de amonio (ElimNH₄) y la eliminación del nitrógeno kjeldahl total (ElimNKT) se encuentran relacionadas positivamente con las *Nitrosomomas* (Nso1225), lo

La Figura 23 representa un diagrama de dispersión de los muestreos, habiendo 24 puntos representados, correspondientes a las 24 fechas de toma de muestras.

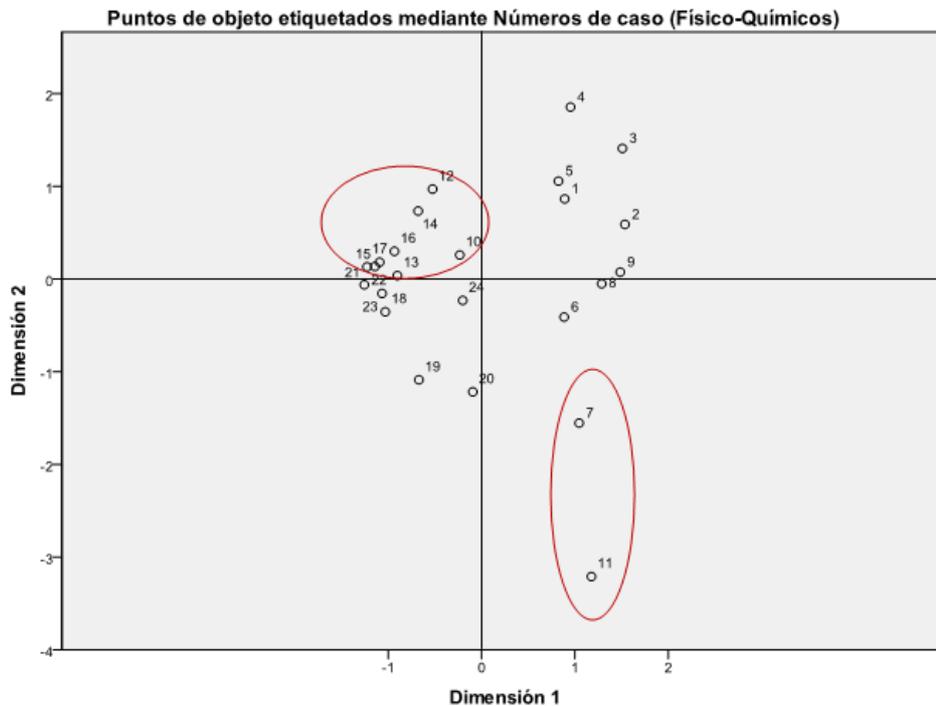


Figura 23. Puntos de objetos según el número de muestra para las variables Físico Químicas

En la Figura 23 puede observarse que una gran cantidad de puntos presentan propiedades semejantes, encontrándose en la zona relacionada con los parámetros de ElimNKT, ElimNH₄ y de bacterias AOB y NOB (Ver la Figura 22), lo que implica que la EDAR de Quart Benager tiene un funcionamiento óptimo con respecto al proceso de nitrificación, teniendo un comportamiento similar durante la mayoría del año.

Sin embargo ha habido un par de muestras de bajo rendimiento de nitrificación. Tal es el caso de la muestra 7 y la muestra 11 que se encuentran señaladas en la Figura 23. Las mismas presentan bajas cantidades de AOB y NOB. Para la muestra 7 correspondiente al día 11/03/2009, se obtuvo una media inferior al 1% de *Nitrospira* y para la muestra 11 correspondiente al día 06/05/2009 se obtuvieron cantidades medias muy bajas de *Nitrosomonas* y de *Nitrospira* (1% y <1% respectivamente) (Tablas 16 y 17). Por lo tanto es de esperarse que con cantidades tan bajas de bacterias nitrificantes la eliminación del amonio y del nitrógeno total kjeldahl sea ineficiente.

En el ACP realizado en el SPSS, se obtuvo que las dimensiones (o componentes) 1 y 2 explican una varianza de un 49,1%, es decir que estas dos componentes acumulan el 49,1% de la variabilidad de las variables originales, siendo el aporte de la primera componente de un 36,6% y de la segunda un 12,4%.

En este análisis se extrajeron una mayor cantidad de componentes que acumulaban un mayor porcentaje de variabilidad con respecto a las variables originales. En este análisis la componente 3 aportaba un 11,3% y la componente 4 un 7,9%. En el presente trabajo únicamente se han representado las dos componentes que aportan un mayor porcentaje acumulado.

En el diagrama de dispersión biespacial de las variables operacionales (Figura 24), no se observaron fuertes relaciones entre las variables y las dimensiones obtenidas. Solo cabe destacar nuevamente la agrupación entre las bacterias nitrificantes (Nso1225, Nmo218 y Ntspa662) en un mismo cuadrante.

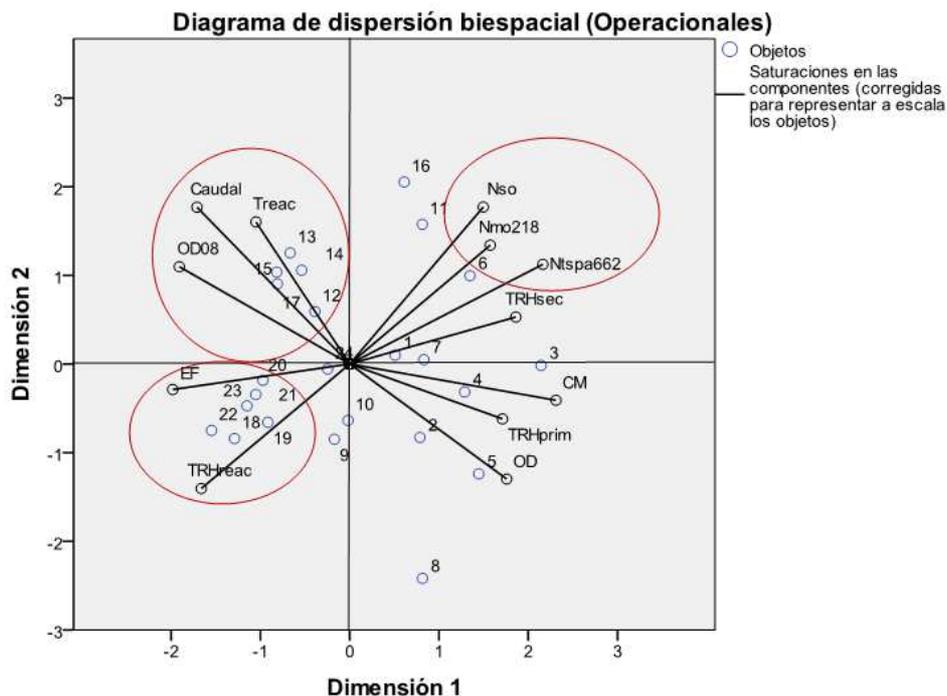


Figura 24. Diagrama de dispersión biespacial de las variables Operacionales.

Los puntos pertenecientes a los meses de verano (muestra del 12 al 17) están relacionados con el caudal, la temperatura del reactor (Treac) y el oxígeno disuelto menor a 0,8 mg/L (OD08). Las

muestras correspondientes a los meses de otoño (de la 19 a la 24) se encuentran más relacionadas con la edad de fango (EF) y con el tiempo de retención hidráulica en el reactor (TRHreac).

En el ACP realizado en el SPSS para las variables operacionales, se obtuvo que para las componentes 1 y 2 la varianza acumulada era de un 49,0% siendo el aporte de la primera componente de un 32,2% y de la segunda un 16,8%. Las componentes 3 y 4, que no se encuentran representadas en el gráfico, aportan una variabilidad con respecto a las variables originales de un 15,6% y un 10,3% respectivamente.

Por último se presenta la Figura 25, correspondiente al diagrama de dispersión biespacial de los protistas presentes en el reactor, donde se observa la fuerte correlación negativa existente entre las amebas testáceas (AT), las amebas pequeñas (AP) y las amebas desnudas (AD) con las AOB (Nso1225), esto se observa debido a la cercanía de los puntos de saturaciones de cada una al eje de la dimensión 2, pero en direcciones opuestas.

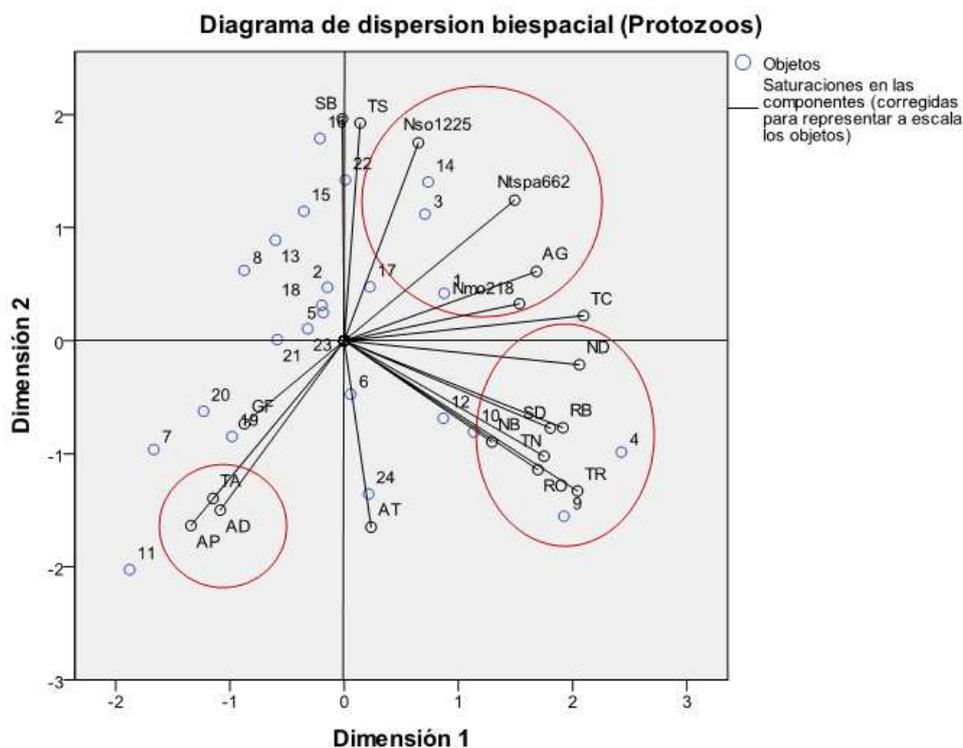


Figura 25. Diagrama de dispersión biespacial de los protistas

Sin embargo, hay una excepción con el grupo de las amebas grandes (AG), las cuales están fuertemente relacionadas con las bacterias nitrificantes, este resultado afirma el obtenido en el análisis de Spearman donde se obtuvo un alto coeficiente positivo entre estos protistas y las NOB. Esta situación ocurre debido a que las *Nitrospira*, en los flóculos observados, forman agregados bacterianos de pequeñas dimensiones que pueden ser consumidos con facilidad por las amebas grandes de tamaño superior a 50 μm .

Gracias al ACP realizado, también es posible extraer información sobre las relaciones entre ciertos protozoos. Esto se observa en el cuarto cuadrante (esquina inferior derecha) donde se encuentra un grupo aglomerado de protistas correspondiente a los nadadores (nadadores bacterívoros, nadadores depredadores, total nadadores), los reptantes (reptantes bacterívoros, reptantes omnívoros y total reptantes) y los sésiles depredadores (SD), estos se encuentran relacionados positivamente entre sí debido que tanto el grupo de los nadadores como el de los reptantes son el alimento de los sésiles depredadores, es por ello que se encuentran tan unidos en el gráfico de dispersión biespacial

En el ACP realizado en el programa SPSS para los protistas presentes, se obtuvo que para las componentes 1 y 2 la varianza acumulada era de un 40,6%, siendo el aporte de la primera componente de un 24,6% y de la segunda un 16,0%. Las componentes 3 y 4 aportan un 14,1% y un 11,1% de variabilidad respectivamente.

Es importante destacar que en este trabajo sólo se representaron gráficamente las dos componentes que aportaban la mayor varianza acumulada.

4.4. Análisis cualitativo de gráficos entre las señales obtenidas de bacterias AOB y NOB y los parámetros de la EDAR.

Se realizaron diversos gráficos para analizar y comparar la evolución temporal de los parámetros físico-químicos, operacionales y de los protistas que arrojaron correlaciones significativas con las bacterias nitrificantes en el análisis bivalente para comparar su comportamiento durante el período del muestreo.

A continuación se presentan estas figuras que muestran la dinámica temporal de las distintas variables analizadas.

4.4.1 Comparación entre la población de AOB (*Nitrosomonas* y *N. oligotropha*) y las NOB (*Nitrospira*).

En el licor mezcla de la EDAR de Quart Benager la presencia de AOB es superior a las NOB, desde la primavera (Mayo 2009) hasta la finalización del verano (Septiembre 2009) se observa una presencia alta de *Nitrosomonas* (Nso1225), teniendo una presencia de un 6% aproximadamente entre toda la población bacteriana (Figura 26).

En la Figura 26 se observa que la población general de AOB correspondiente al género *Nitrosomonas* (sonda Nso1225) está muy relacionada con la población de *N. oligotropha* (sonda Nmo218). La sonda Nmo218 está contenida en la sonda general Nso1225 (Figura 13) lo que implica que la mayoría de las *Nitrosomonas* presentes corresponden a la especie *N. oligotropha*, siendo el 100% de las mismas en 9 muestras.

Sin embargo, también se puede observar que en el período de verano otra especie de *Nitrosomonas* fue la dominante, demostrando estos resultados la existencia de una fuerte dinámica temporal de las AOB durante un período estable de nitrificación (Ver Figura 26).

Durante el período donde la población de *N. oligotropha* disminuye, manteniéndose las *Nitrosomonas* estables, las *N. oligotropha* llegan a ser un 17% de la población total de *Nitrosomonas*, esta caída ocurre en la muestra 16 correspondiente al día 15/07/2009 y se encuentra remarcada en la Figura 26.

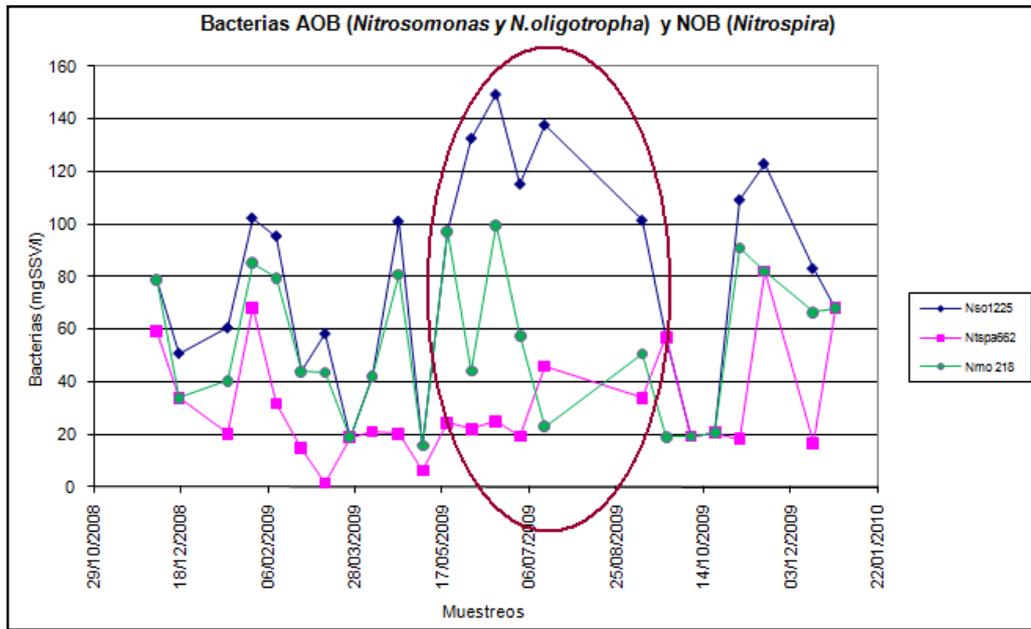


Figura 26. Abundancia en porcentaje de *Nitrosomonas* (Nso1225), *N. oligotropha* (Nmo218) y *Nitrospira* (Ntspa662) en el licor mezcla de la EDAR de Quart Benàger.

En los meses cálidos (desde mayo a septiembre) las *Nitrosomonas* aumentaron su población, sin embargo las *N. oligotropha* presentaron una fuerte caída, esto puede deberse a la disminución de la DQO, DBO, N-NH₄ y del fósforo en el afluente, viéndose las *N. oligotropha* afectadas por la disminución de estos compuestos que les proporcionan la energía necesaria para su desarrollo. Sin embargo también se observa que la disminución de estos parámetros parece favorecer a poblaciones de *Nitrosomonas* distintas a las del sublinaje *N. oligotropha*.

Durante la mayoría de este período las bacterias identificadas por la sonda NEU arrojaron resultados positivos, sin embargo debido a que las hibridaciones con la sonda Nse1472 dieron negativas (Ver Figura 13) se puede corroborar que parte de las AOB presentes corresponden al sublinaje de *Nitrosococcus mobilis*.

Las NOB tienen menor abundancia, siendo el día de menor presencia el 11/03/2009, con una presencia inferior al 1%. Su pico más alto fue de un 4% el 28/01/2009. Durante los meses de primavera – verano, varía entre 1% y 3%, siempre manteniéndose la población de *Nitrospira* (NOB) igual o inferior a las AOB (*Nitrosomonas*).

En la Figura 27 se compara la eliminación de N-NH_4^+ con las *Nitrosomonas* (identificadas por la sonda Nso1225), observándose una clara relación entre las mismas en todos los muestreos. Cuando hay un crecimiento de la población de AOB existe un mayor rendimiento de eliminación de N-NH_4^+ , por el contrario cuando disminuye la población de *Nitrosomonas* el rendimiento también se ve disminuido a causa de la escasez de bacterias que eliminan este compuesto en el sistema.

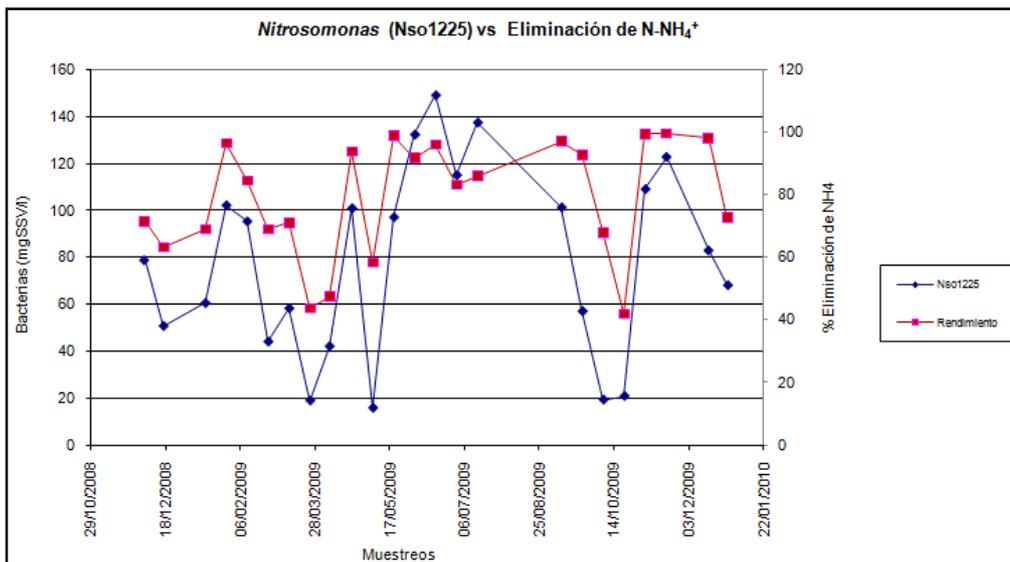


Figura 27. Comparación de la cantidad de AOB del género *Nitrosomonas* (Nso1225) con el Rendimiento de eliminación de N-NH_4^+

4.4.2 Análisis cualitativo de los parámetros físico-químicos

Uno de los parámetros que mostró una correlación significativa con las *Nitrosomonas* (Nso1225) fue el caudal de DQO afluente, con un coeficiente de Spearman de -0,640. Se observa en la Figura 22 como al aumentar el caudal de DQO afluente disminuye la cantidad de *Nitrosomonas*. Este comportamiento se ve claramente en el período de primavera-verano 2009.

En el caso de las *Nitrospira* (Ntspa662), también se observa una correlación de Spearman negativa de -0,280 (Tabla 22) con respecto al caudal de DQO afluente, sin embargo este valor no representa una correlación significativa entre este parámetro con las NOB. En la Figura 28, que se encuentra a continuación, se muestra el perfil de las AOB y NOB con respecto al caudal de DQO total en el afluente.

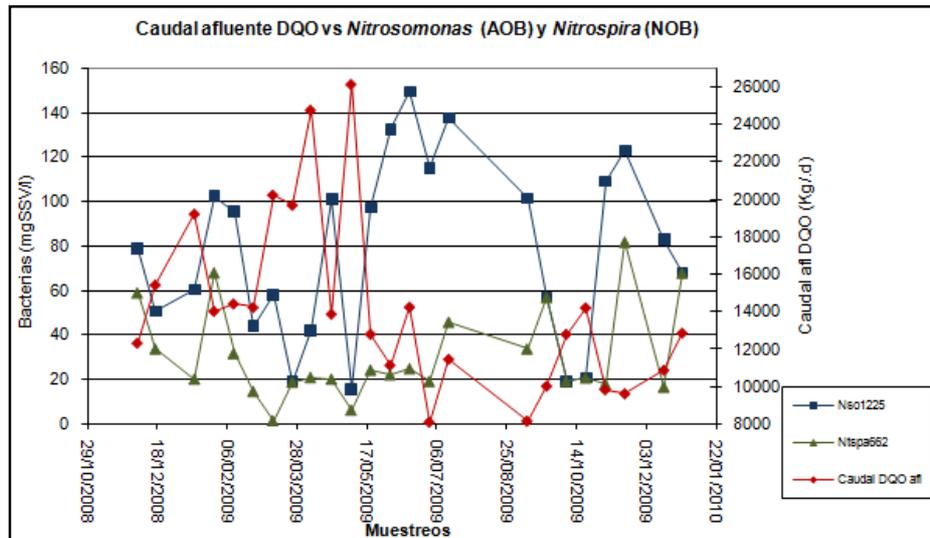


Figura 28. Comparación entre el Caudal afluente de DQO total y las sondas generales estudiadas.

El amonio del efluente presentó una correlación negativa significativa con respecto a las AOB, con coeficientes de Pearson de $-0,789$ y $-0,692$ para las *Nitrosomonas* y las *N.oligotropha* respectivamente y coeficientes de Spearman de $-0,820$ para las *Nitrosomonas* y $-0,781$ para las *N.oligotrophas* (véase la Tabla 22). Estas correlaciones implican que a medida en que aumenta la cantidad de AOB en el licor mezcla, disminuirá la cantidad de amonio a la salida de la planta. Este comportamiento se puede observar de forma clara en la Figura 29 que se presenta a continuación.

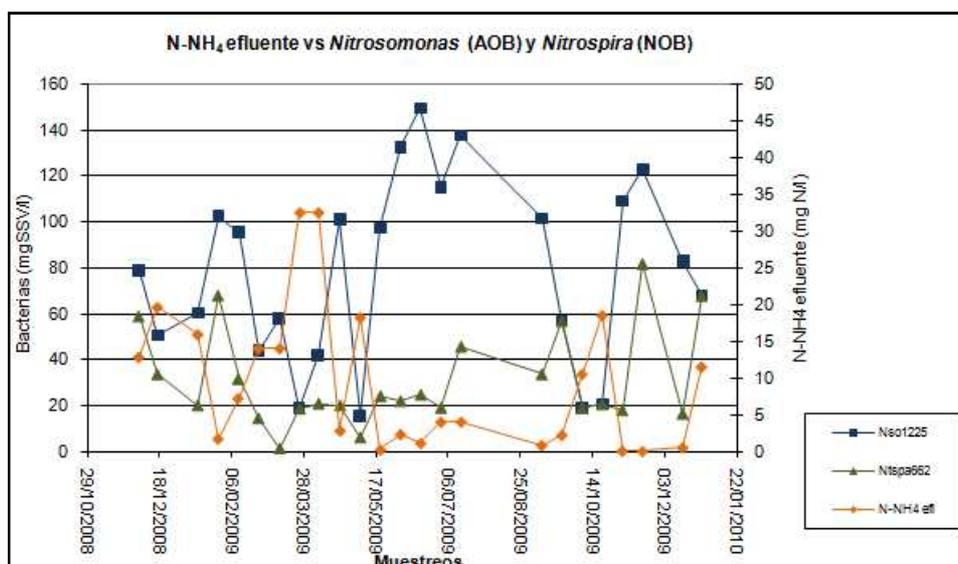


Figura 29. Comparación entre el Nitrógeno soluble y el $N-NH_4$ en efluente y las sondas generales estudiadas.

4.4.3 Análisis cualitativo de variables operacionales

La carga másica (CM) es un parámetro determinante en el proceso de nitrificación, y esto se ha visto reflejado en el análisis bivalente donde se obtuvieron correlaciones negativas significativas entre este parámetro y las bacterias nitrificantes (véase la Tabla 23). Para corroborar esta información se graficaron los valores de la CM y de las *Nitrosomonas* (Nso1225) y *Nitrospiras* (Ntspa662) de todos los días de muestreo, observándose que efectivamente a CM débiles se favorece la nitrificación debido al aumento de bacterias nitrificantes en el sistema (Figura 30).

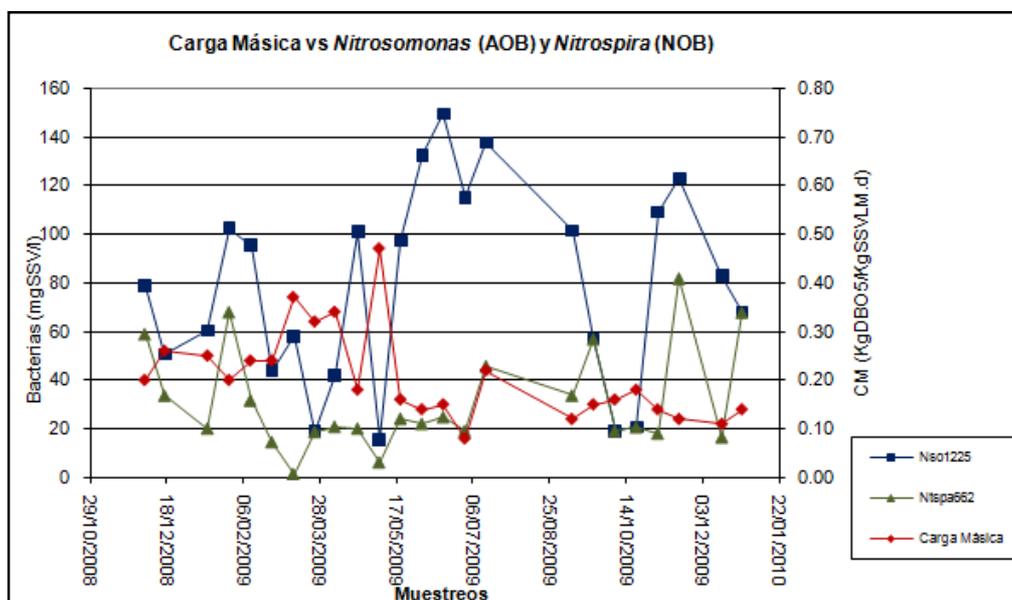


Figura 30. Comparación entre la Carga Másica (CM) y las sondas generales estudiadas (Nso 1225 y Ntspa662).

Otro parámetro operacional que arrojó coeficientes positivos significativos en el análisis bivalente es la edad de fango. Por ello, se graficaron estos valores de muestro con respecto a las *Nitrosomonas* (Nso1225) y las *Nitrospira* (Ntspa662), donde se afirma que las edades de fango altas favorecen el crecimiento de las bacterias nitrificantes (Figura 31).

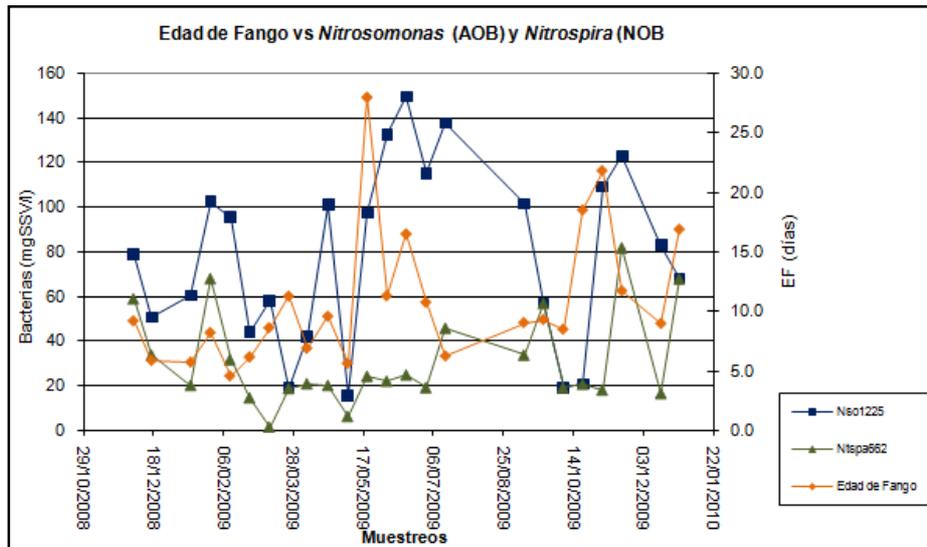


Figura 31. Comparación entre la edad de fango (EF) y las sondas generales estudiadas (Nso 1225 y Ntspa662).

4.4.4 Análisis cualitativo de protozoos presentes en licor mezcla

Los protistas que presentaron correlaciones más fuertes con las bacterias nitrificantes en el análisis bivalente realizado fueron los ciliados reptantes, donde se obtuvieron coeficientes de Pearson y de Spearman positivos representativos, deduciéndose que estos protozoos abundan cuando las AOB y NOB aumentan su presencia.

Esta situación se ve reflejada en la Figura 32, donde sobretodo durante los cinco primeros meses del año 2009 y los últimos tres meses del mismo año se observó un comportamiento semejante entre estas dos poblaciones. Durante los meses de verano hay un decrecimiento de la población de reptantes, esto podría deberse a que en estos meses cambian las condiciones físico-químicas referentes a la DQO, la DBO, el nitrógeno y el fósforo en el afluente de la planta.

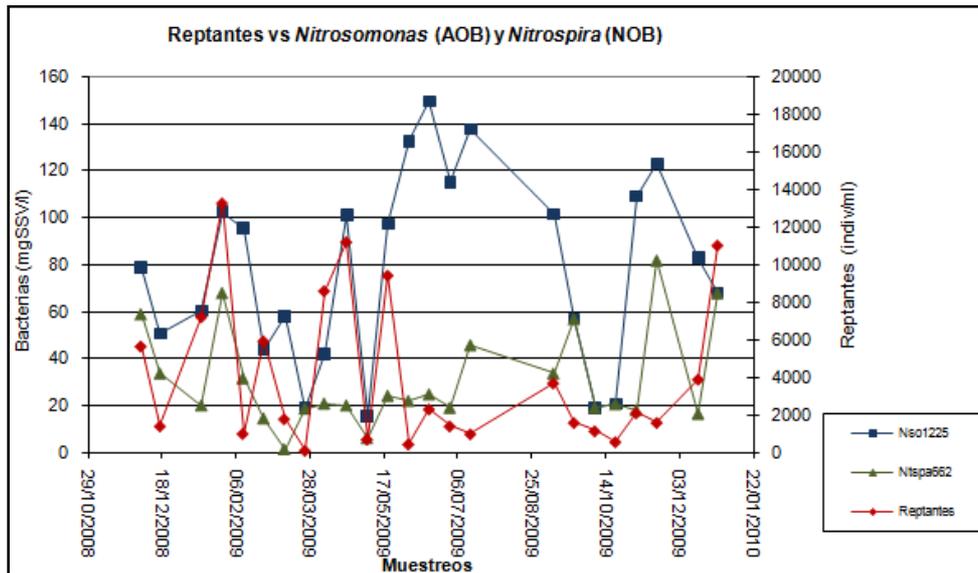


Figura 32. Comparación entre la población Total de Reptantes en el LM y las poblaciones de AOB estudiadas (Nso 1225 y Nmo 218).

5. Discusión

Estructura de las comunidades de AOB. Mediante el análisis con la técnica FISH con las sondas Nso1225 (*Nitrosomonas*), Nmo218 (*N. oligotropha*), NEU (*Nitrosococcus mobilis*, *Nitrosomonas sp Nm104*, *N.europaea*, *N.eutropha*, *N. halophila*) y Nse1472 (*N.europaea*, *N.eutropha*, *N.halophila*) se ha observado la presencia de varias poblaciones AOB diferentes presentes en el reactor (Ver Figuras 17, 18 y 19).

En el licor mezcla del reactor biológico se observó que la población dominante de las AOB presentes corresponden al género *N. oligotropha*. Gracias a las hibridaciones realizadas con la sonda Nmo218 se puede verificar que en ciertos muestreos la cantidad de *Nitrosomonas spp* obtenida mediante la sonda Nso1225 es igual a la obtenida con la sonda Nmo218. Esta situación se puede apreciar en la Figura 26 donde en los muestreos 6, 8, 11, 12, 19, 20 y 24 la cantidad de bacterias identificadas por ambas sondas fue la misma. En el resto de las muestras se observa una diferencia de entre un 1 a un 4% entre la cantidad de bacterias identificadas con las Nso1225 y las Nmo218.

Ya que la hibridación con la sonda Nse1472 dio negativa, se descarta la presencia de *Nitrosomonas europea*, *eutropha* y *halophila*, por lo tanto las bacterias identificadas por la sonda NEU en las muestras donde daba positiva (véase Tabla 18) corresponden a las especies *Nitrosococcus mobilis* (Figura 13).

En estudios anteriores se ha observado que las bacterias correspondientes al linaje *N. oligotropha* han sido detectadas en ambientes de agua dulce y salada (Speksnijder *et al*, 1998), también en hábitats terrestres (Kowalchuk *et al*, 2000) y en lodos activos (Purkhod *et al*, 2000), lo que sugiere una gran versatilidad fisiológica e importancia ecológica. Debido a esta diversidad se obtiene que las *N. oligotropha* se adaptan a concentraciones de sustrato bajas (Gieseke, 2000). Esta situación se confirma con los resultados obtenidos en el presente estudio, donde se obtuvo correlaciones negativas significativas entre las *Nitrosomonas*, las *N. oligotropha* y las concentraciones de nitrógeno en el afluente (Véase la Tabla 18), explicándose así la afinidad existente entre estas especies y las concentraciones bajas de sustrato.

Con respecto a los requerimientos de oxígeno, Gieseke y colaboradores (2000) dedujeron que debido a que las *N. oligotropha* tienen una alta afinidad al OD, esto les permite una buena competición con las bacterias heterótrofas que están activas al comienzo del período de aireación por el oxígeno disuelto (Gieseke *et al*, 2000); en el presente estudio debido a que las concentraciones de OD se mantienen bastante constantes a lo largo del año, con un valor medio de $1,23 \pm 0,13$ mg/L (Véase Tabla 20), siendo estos valores adecuados para una buena nitrificación a temperaturas cálidas (Ya *et al*, 2010), se mantiene la presencia de *N. oligotropha* en el licor mezcla con algunas fluctuaciones.

Sin embargo cabe destacar que existen correlaciones fuertemente negativas entre las *Nitrosomonas* y las *N. oligotropha* con respecto a la DQO y los SSV en el afluente. Esto ocurre precisamente por la alta competencia de las bacterias por el sustrato, debido a que las AOB son de crecimiento lento (Coskuner *et al*, 2002), les es más difícil competir por el sustrato con el resto de poblaciones bacterianas presentes en el licor mezcla.

Estructura de las comunidades de NOB. Los géneros *Nitrospira* y *Nitrobacter* son los claves para la oxidación del nitrito en las EDAR. Actualmente existe la hipótesis que el género *Nitrospira* pueden necesitar menores cantidades de nitrito que el género *Nitrobacter* y que este último tiene un crecimiento más acelerado que el género *Nitrospira* (Kim *et al*, 2006).

Según Kim y colaboradores (2006) la distribución de *Nitrobacter* y *Nitrospira* depende principalmente de las concentraciones de nitrito (Kim *et al*, 2006). Este estudio se ha visto confirmado por otros, como el realizado por Vázquez-Padín *et al*. (2009) donde se ha demostrado que al incrementarse las concentraciones de nitrito aumenta la presencia de *Nitrobacter* en los gránulos. En sus experimentos alimentaban amonio a un reactor SBR y al cabo de unos 65 días cambiaron la alimentación a nitrito, a partir de ese momento observaron una desaparición de *Nitrosomonas*, permitiendo así el desarrollo de una importante población de *Nitrobacter*. Cuando únicamente se alimentaba amonio al reactor los gránulos estaban compuestos por un 60% *Nitrosomonas* y 30% *Nitrospira*, luego de cambiar a nitrito como alimento, la composición granular era de un 45% *Nitrobacter* y 40% *Nitrospira*, esto a los 177 días después del cambio en la alimentación (Vázquez-Padín, 2009).

En el presente estudio únicamente se encontró el género *Nitrospira* como NOB. En ninguna de las muestras se observó presencia de *Nitrobacter*. Sin embargo tanto en el afluente como en el licor mezcla la cantidad de nitrito era suficiente para el desarrollo de ambos géneros, por lo tanto se cree que el factor limitante para el crecimiento de *Nitrobacter* en la EDAR de Quart Benager podría ser el oxígeno disuelto, siendo otro factor importante para el desarrollo de las distintas especies de NOB.

Huang y colaboradores (2010) realizaron estudios en un tanque aireado de fangos activos en California, donde observaron que el aumento de la concentración de oxígeno disuelto fue adecuado para el crecimiento de *Nitrobacter*, mientras que *Nitrospira* se enriqueció de forma selectiva cuando las concentraciones de OD fueron menores de $<1,0$ mg/l (Huang *et al*, 2010).

En el reactor estudiado la concentración de oxígeno disuelto media durante todo el año fue de 1,23 mg/L, siendo el mínimo 1,02 mg/L y el máximo 1,6 mg/L. Es por ello que el OD presente es el limitante para la nitrificación (Tabla 20). Esto tiene como consecuencia la presencia únicamente de *Nitrospira* en el reactor, estando en concordancia con los estudios anteriormente realizados, donde se concluye que la presencia de *Nitrospira* se ve favorecida a concentraciones de OD bajas (Schramm, 2003).

La adaptación de las *Nitrospira* a las condiciones de escasez de oxígeno, según Okabe *et al*. (2000) se debe a que la oxidación del amonio y del nitrito ocurre en diferentes zonas de la biocapa, en la superficie y en la parte interna respectivamente. Esto indica que las AOB tienen una velocidad de crecimiento superior a las NOB y a su vez una mejor adaptación de las *Nitrospira* a condiciones bajas de oxígeno.

Parámetros físico-químicos con respecto a las AOB y NOB. Con respecto a los análisis realizados con los parámetros físico-químicos y las bacterias se han obtenido resultados acordes al proceso de nitrificación. La cantidad de nitrógeno total, de amonio (NH_4^+) y de NKT en el efluente disminuye al aumentar la cantidad de bacterias nitrificantes, esto se observa en el presente estudio con las fuertes correlaciones de Pearson y Spearman obtenidas entre estas variables y las bacterias nitrificantes.

Otras correlaciones significativas obtenidas han sido las concernientes a la DQO_t, el caudal de DQO y la DQO soluble en el afluente con las AOB. Esta situación puede deberse a la disminución de OD debido a la alta actividad metabólica de las bacterias heterótrofas que consumen rápidamente el sustrato (DQO soluble) y el oxígeno. Esta competencia por parte del resto de las bacterias se manifiesta con las correlaciones significativas negativas obtenidas en el análisis bivariante de Pearson y Spearman entre los SSV en el afluente y las AOB (Tabla 22), siendo la cantidad de SSV en el afluente equivalente a los microorganismos presentes.

Los compuestos de nitrógeno y de fósforo en el afluente, como por ejemplo el amonio (NH_4^+) y el fosfato (PO_4), tienen fuertes correlaciones negativas con respecto a las AOB. Estos compuestos tienen una distribución en su perfil anual proporcional a la DQO, por lo tanto cuando hay presencia de una alta DQO también entra una gran cantidad de amonio y fosfato. Debido a que en la planta estudiada, las *N. oligotropha* representan una mayor proporción de las AOB total, y estas bacterias se adaptan a concentraciones de sustrato bajas (Gieseke, 2000), se puede concluir que a concentraciones bajas de amonio en el afluente, las AOB del tipo *N. oligotropha* se verán favorecidas.

Un dato sumamente interesante son las correlaciones negativas significativas existentes entre los tensioactivos aniónicos en el afluente con respecto a las *Nitrosomonas* (Ver Tabla 22). No se ha encontrado ninguna referencia bibliográfica sobre el efecto tóxico de los tensioactivos en la inhibición de la nitrificación. Este resultado se ve apoyado por el ACP realizado donde se observa una correlación negativa, esta vez con los tensioactivos aniónicos en el efluente (Ver Figura 22). A mayor presencia de tensioactivos en el sistema (tanto en el afluente, como en el efluente) menor será la cantidad de bacterias nitrificantes en el licor mezcla y por lo tanto se verá disminuido el rendimiento de la nitrificación.

Los aldehídos y los sulfitos en el afluente presentaron correlaciones de Pearson y de Spearman fuertemente negativas con respecto a las AOB y NOB estudiadas. Sin embargo en el ACP realizado no se obtuvo una relación evidente entre estos parámetros y las bacterias nitrificantes,.

A pesar de los efectos inhibidores en la nitrificación producidos por los metales, en este estudio no se observaron evidencias de inhibición por parte de estos compuestos. Por lo tanto se concluye

que las concentraciones de los metales presentes en el sistema no llegan a ser nocivas para la supervivencia de las bacterias nitrificantes.

Parámetros operacionales con respecto a las AOB y NOB. En el ACP realizado se observa una fuerte relación entre el TRH del reactor y del decantador secundario (Figura 22), así como también se obtuvieron correlaciones positivas entre dichos parámetros y las bacterias presentes en el reactor al realizarse el análisis de Pearson y Spearman. Esto indica que las bacterias se adaptaran mejor al medio al aumentar estos factores.

Sin embargo el parámetro operacional de mayor importancia en este estudio ha sido la edad de fango (o tiempo de retención celular) donde se han observado correlaciones positivas fuertes de Pearson y Spearman entre las bacterias nitrificantes y dicho parámetro. Sobre todo con las *N. oligotropha*, las correlaciones tienen valores de 0,460 y de 0,422 para los coeficientes de Pearson y Spearman respectivamente. Esto indica que a mayor permanencia de las bacterias en el sistema, será mayor su presencia. Esta situación confirma los estudios anteriormente realizados donde se debe tomar en cuenta una edad de fango adecuada (en combinación con la temperatura) para que se lleve a cabo una adecuada nitrificación (Müller *et al*, 2003; Gonzalez *et al*, 2010).

Müller *et al*. (2003), en sus trabajos mencionaron que la edad de fango mínima para nitrificar es entorno a los 7 días, aunque los cambios de temperatura afectan a este parámetro. En Quart Benager, durante el período de tiempo estudiado (diciembre 2008-diciembre 2009) el promedio de edad de fango anual fue de 10,8 días, siendo el valor mínimo un 4,6 días y el máximo 28 días, con una temperatura media de $21,4 \pm 3,7$ °C (Tabla 20), dichos valores representan una combinación adecuada para una efectiva nitrificación en el sistema.

La presencia de una mayor cantidad de AOB frente a NOB, puede deberse también a la edad de fango, ya que las *Nitrosomonas* son de crecimiento más rápido que las *Nitrospira*, que son de crecimiento de muy lento (Yu *et al*, 2010).

Otro factor operacional importante es la carga másica (CM), ya que se observaron correlaciones significativas negativas de Pearson y Spearman con las bacterias nitrificantes. Esto quiere decir que a CM bajas se verá favorecida la nitrificación en el sistema. Esto corrobora la bibliografía donde se dice que la CM de operación para el proceso de nitrificación debe ser menor, es decir

que la EF debe ser mayor, para que el crecimiento de las bacterias autótrofas se vea favorecido frente a las bacterias heterótrofas que son de crecimiento más rápido que éstas (Ferrer *et al*, 2007).

Protistas con respecto a las AOB y NOB.

Los protistas que parecen tener mayor impacto respecto a las bacterias nitrificantes en la EDAR de Quart Benáger en el período de tiempo estudiado son los reptantes. Los flagelados parecen tener un menor rol como bioindicador de la nitrificación.

Pajdak-Stós y colaboradores (2010) observaron que con el incremento del tamaño de las colonias de nitrificantes también aumentaba el número de ciliados reptantes (sobre todo del género *Aspidisca*). Esto es debido a que los fóculos forman agregados mas grandes inaccesibles a los protozoos reptantes que prefieren alimentarse de bacterias poco adheridas al flóculo (Young, 2006; Pajdak-Stós, 2010). El estudio realizado en el presente trabajo confirma esta situación gracias a las correlaciones positivas significativas entre los reptantes presentes en el sistema y las bacterias nitrificantes estudiadas (Tabla 24). Por lo tanto se concluye que el aumento de la presencia de ciliados reptantes en el sistema podría ser un bioindicador de una efectiva nitrificación.

Los ciliados totales (que comprenden los ciliados reptantes, nadadores y sésiles) también tienen un coeficiente positivo de Pearson y Spearman elevado. Sin embargo no es conveniente sacar conclusiones de los mismos debido a la gran cantidad de géneros pertenecientes a este grupo. Por esta razón se recomienda continuar con el presente estudio de forma exhaustiva con cada uno de los géneros de protistas presentes.

El grupo de amebas testáceas, amebas desnudas y de amebas pequeñas esta inversamente relacionado con la presencia de bacterias nitrificantes; esto se puede observar tanto en el análisis bivariante, con coeficientes negativos en los análisis de Pearson y Spearman (Ver Tabla 22), como en el ACP realizado en el gráfico de dispersión biespacial (Ver Figura 25). Sin embargo las amebas grandes se encuentran fuertemente relacionadas con las AOB y NOB, sobre todo con estas últimas. Esto se debe a que, como se ha mencionado anteriormente, las amebas grandes

tienen la capacidad de consumir grupos bacterianos pequeños, que podrían ser los formados por las *Nitrospira*.

Por último, gracias a este estudio, se pudieron obtener posibles relaciones entre diversos grupos de protistas. Tal es el caso de los nadadores y reptantes relacionados con los sésiles depredadores que se encuentran agrupados en el diagrama de dispersión biespacial de los protozoos. Esta situación se debe a que los sésiles depredadores, que se encuentran fijos en el flóculo, consumen a los nadadores y reptantes que se encuentran de forma libre en el licor mezcla.

6. Conclusiones

Las principales conclusiones que se pueden extraer de este trabajo son las siguientes:

- La mayoría de las bacterias AOB presentes en el licor mezcla de la EDAR de Quart Benager durante el período de diciembre de 2008 a diciembre de 2009 corresponden al género *Nitrosomonas* (entre un 1 y un 6% de las bacterias totales), siendo la especie dominante la *N. oligotropha* identificada mediante la sonda Nmo218.
- Las bacterias NOB presentes corresponden al género *Nitrospira* (con una presencia de <1% a un 4% de la población total de bacterias). La dominancia de este género se debe a las bajas concentraciones de oxígeno disuelto (OD), que favorecen su crecimiento e inhiben la presencia de *Nitrobacter*.
- Existe una dinámica poblacional de las bacterias AOB durante el año estudiado, con períodos donde las *Nitrosomonas oligotropha* (Nmo218) abundan y otros en que su presencia es escasa. También se han detectado otras bacterias AOB como *Nitrosomonas* sp. y *Nitrosococcus mobilis* (NEU) aunque en concentraciones bajas. A pesar de estos cambios en las poblaciones de AOB, se ha mantenido un buen rendimiento en la eliminación del amonio, con una media del 79% durante el período de diciembre 2008-diciembre 2009.
- Las bacterias nitrificantes disminuyen al aumentar la presencia de materia orgánica biodegradable en el afluente. Esta situación pudo observarse al realizar el análisis estadístico bivariante (correlaciones significativas negativas de Pearson y Spearman) y en el análisis de componentes principales. Esto se puede deber a la disminución de OD a causa de la alta actividad metabólica de las bacterias heterótrofas que consumen rápidamente el sustrato y el oxígeno.
- La nitrificación en el sistema se ve favorecida a cargas másicas bajas lo que se corresponde con edades de fangos altas, gracias a que se ve favorecido el crecimiento de

las bacterias nitrificantes por ser lento y debido a ello requiere una mayor cantidad de tiempo en el sistema.

- Los reptantes omnívoros y el grupo del total de reptantes son bioindicadores de una buena nitrificación, debido a que su crecimiento óptimo se presenta a cargas másicas bajas, la cual es una condición necesaria para un buen rendimiento de nitrificación. Esto se manifestó con correlaciones positivas significativas de Spearman entre reptantes omnívoros y el total de reptantes y las *N. oligotropha*.
- Las amebas grandes mayores a 50 μm podrían ser depredadoras de las NOB debido a su capacidad para consumir agregados bacterianos. Estos protistas tienen preferencia por las NOB sobre las AOB debido a que estas últimas forman flóculos de mayor tamaño que las NOB en la depuradora estudiada.
- Los tensioactivos aniónicos podrían ser inhibidores de la nitrificación, porque se han obtenido coeficientes de Pearson y Spearman significativos inversamente proporcionales entre las bacterias nitrificantes y los tensioactivos aniónicos; además en el ACP de las variables físico-químicas y bacterias nitrificantes se ha observado una relación similar entre los tensioactivos aniónicos y las bacterias nitrificantes.

7. Recomendaciones

Al finalizar este trabajo se recomienda continuar con las siguientes investigaciones:

- Realizar las hibridaciones con el resto de las sondas identificadoras de AOB para determinar con exactitud todas las subespecies presentes que integran a la sonda general Nso1225.
- Realizar un estudio amplio de cada género de protistas presentes para determinar cuál de ellos actúa como depredador o como bioindicador de la nitrificación.
- Ampliar el estudio de las bacterias nitrificantes y sus relaciones con los parámetros físico-químicos, biológicos y operacionales en otras EDAR.

8. Referencias

Aguado, D. 2004. Aplicación de métodos estadísticos multivariantes para la modelación y la monitorización de un reactor discontinuo secuencial para el tratamiento de aguas residuales. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia

Alonso, J., Cuesta, G., Ramírez, G., Morenilla, J., Bernácer, I., Lloret, R. 2009. Manual de Técnicas Avanzadas para la Identificación y Control de Bacterias Filamentosas. P. 21-36. Ed. Epsar-Generalitat Valenciana. Valencia, España.

Amann R., Binder B., Olson R., Chisholm S., Devereux R. and Stahl D. A. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1919-1925.

Amann R. 1995. In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. En: *Molecular Microbial Manual* . Akkermans A.D.L., van Elsas, J.D., y de Bruijn, F.J. p. 1-15. Kluwer Academic Publications.

APHA-AWWA-WEF. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. American public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washintong, DC, USA.

Arregui, L., Muñoz, C., Guinea, A. y Serrano, S. (2003) FLUTAX employment simplifies the visualization of the ciliature of oxytrichid hypotrichs. *Eur. J. Protistol.* 39:169–172.

Attard, E., Commeaux, C., Laurent, F., Terada, A., Smets, B., Recous, S y Le Roux, X. 2010. Shifts between Nitrospira- and Nitrobacter-like nitrite oxidizers underline the response of soil potential nitrite oxidation to changes in tillage practices. *Environmental Microbiology.* 12(2): 315-326.

Bitton, G., Dutkák, B., y Hendricks, C. 1989. Ecological Assessment of Hazardous Waste sites. W. Warren-Hicks, B.R. Parkhurst y S.S Baker, Jr., U.S. EPA, Corvallis, Oregon, Estados Unidos.

Bitton, G. 1994. Wastewater Microbiology. Wiley-Liss. Tercera Edición. Universidad de Florida. Estados Unidos.

Bitton, G. 2011. Wastewater Microbiology. Wiley-Liss. Quinta Edición. Universidad de Florida. Estados Unidos.

Borrás, L. 2008. Técnicas microbiológicas aplicadas a la identificación y cuantificación de microorganismos presentes en sistemas EBPR. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia. España.

Catalán, J. 1997. Depuradoras “Bases Científicas”. BELLISCO, Librería Editorial. Madrid, España.

Coskuner, G y Curtis, P. 2002. In situ characterization of nitrifiers in an activated sludge plant: detection of Nitrobacter Spp. *Journal of Applied Microbiology*. 93: 431-437.

Conover, W. 1998. Practical nonparametric statistics. 3era. edición John Wiley & Sons. Nueva York.

Daims H., Brühl A., Amann R., Schleifer K.-H. and Wagner M. 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* 22: 434-444.

Daims, H., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H., Schleifer K.H., y Wagner, M. (2001). In situ characterization of Nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:5273-5284.

Daims, H., Stoecker, K y Wagner, M. 2002. Fluorescence in situ hybridization for the detection of prokaryotes. En: Osborn, A. M. y Smith, C. J. *Molecular Microbial Ecology*. p. 213-218. Ed. BIOS Advanced Methods. Abingdon, Reino Unido.

Daims, H., Maixner, F., Schmid, M.C. 2009. the Nitrifying microbes: Ammonia oxidizers, nitrite oxidizers, and anaerobic ammonium oxidizers. En: Nielsen, P., Daims, H y Lemmer, H. 2009. *FISH Handbook for Biological Wastewater Treatment: Identification and quantification of microorganisms in activated sludge and biofilms by FISH*. p 9-17. Ed. IWA Publishing. Londres, Reino Unido.

Fernández-Galiano, D. 1976. Silver impregnation of ciliated protozoa: procedure yielding good results with the pyridinated silver carbonate method. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 95:557–560.

Fernández-Galiano, D. 1994. The ammoniacal silver carbonate method as a general procedure in the study of protozoa of sewage (and other) waters. *Water Res.* 28:495–496.

Ferrer, J y Seco, A. 2007. *Tratamientos Biológicos de Aguas Residuales*. Editorial UPV. Valencia, España.

Ferrer, J y Seco, A. 2009. *Tratamientos Físicos y Químicos de Aguas Residuales*. Editorial UPV. Valencia, España.

Horan, N. 2003. Protozoa. En: Duncan, M., Horan, N. 2003. *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. Ed. Academic Press. California, Estados Unidos.

Gerardi, M. 2002. *Nitrification and denitrification in the activated sludge process*. Wiley-Interscience. Nueva York. Estados Unidos.

Grady, C. 1989. Dynamic modeling of suspended growth biological wastewater treatment processes. En G. Patry and D. Chapman (eds) *Dynamic Modeling and Expert Systems in Wastewater Engineering* (pp. 1-38). Chelsea, Michigan: Lewis Publishers.

Gieseke, A., Purkhold, U., Wagner, M., Amann, R y Schramm, A. 2000. Community Structure and Activity Dynamics of Nitrifying Bacteria in a Phosphate-Removing Biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 1351-1362.

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.

Huang, Z., Gedalanga, P., Asvapathanagul, P y Olson, B. 2010. Influence of physicochemical and operational parameters on Nitrobacter and Nitrospira communities in an aerobic activated sludge bioreactor. *Water Research*. 44: 4351-4358.

Jenkins, D., Richard, M., Daigger, G. 2004. *Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming*. 3th Ed.. Lewis publishers. Nueva York, EEUU.

Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K-H, Pommerening-Röser, A., Koops, H-P y 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.

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.

Koops, H. y Pommerening –Roser, A. 2001. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiology Ecology*. 37: 1-9.

Kowalchuk, G., Stienstra, A. Heilig, H., Stephen, J y Woldendorp, J. 2000. Molecular analysis of ammonia-oxidising bacteria in soil of successional grasslands of the Drentsche A (The Netherlands). *FEMS Microbiol. Ecol.* 31:207-215.

Kowalchuk, G y Stephen, J. 2001. Ammonia-Oxidizing Bacteria: A Model for Molecular Microbial Ecology. *Annual Review of Microbiology*. 55: 485-529.

Madoni, P. 1988. I protozoi ciliate nel controllo di efficienza dei fanghi attivi. *Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale, Reggio Emilia*.

Matsumoto, S., Katoku, M., Saeki, G., Terada, A., Aoi, Y, Tsuneda, S., Picioreanu, C y –van Loosdrecht, M. 2010. Microbial community structure in autotrophic nitrifying granules characterized by experimental and simulation analyses. *Environmental Microbiology*. 12(1): 192-206.

Mobarry B., Wagner, M., Urbain, V., Rittmann B. y Stahl, D. 1996. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2156-2162.

Mota, C., Ridenoure, J., Cheng y De los Reyes, F. 2005. High levels of nitrifying bacteria in intermittently aerated reactors treating high ammonia wastewater. *FEMS Microbiology Ecology*. 54: 391-400.

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.

Nielsen, J. 2009. Protocol for Fluorescence in situ Hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotides. En: Nielsen, P., Daims, H y Lemmer, H. 2009. *FISH Handbook for Biological Wastewater Treatment: Identification and quantification of microorganisms in activated sludge and biofilms by FISH*. p. 73-84. Ed. IWA Publishing. Londres, Reino Unido.

Okabe, S y Watanabe, Y. 2000. Structure and function of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Water Science & Technology*. 42: 21-32.

Pajdak-Stós, A., Fialkowska, E., Fyda, J y Babko, R. 2010. Resistance of nitrifiers inhabiting activated sludge to ciliate grazing. *Water Science & Technology*. 61.3: 573-580.

Pérez, C. 1996. *Econometría y análisis estadístico multivariable con Statgraphics*. Editorial RA-MA. Madrid, España.

Pérez, Uz., Arregui, L., Calvo, P., Salvadó, H., Fernández, N., Rodríguez, E., Zornoza, A y Serrano, S. 2010. Assessment of plausible bioindicators for plant performance in advanced wastewater treatment systems. *Water Research*. 44: 5059-5069.

Purkhold, U., Pommerening-Röser, A., Juretschko, S., Schmid, M., Koops, H y 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3982-3989.

Purkhold, U., Wagner, M., Timmermann, G., Pommerening-Röser, A y 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 Nitrosomonas. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1485-1494.

Reyes, M. 2010. *Poblaciones microbianas en los procesos biológicos de aguas residuales: Fangos Activos y Digestión Anaerobia*. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.

Roncero, S. 2009. Identificación y Cuantificación de bacterias nitrificantes con la técnica FISH y sondas EUB338 y NSO 1225 RNA en EDARs de la Comunidad Valenciana. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.

Salvado, H. y Gracia, M. 1993. Determination of organic loading rate of activated sludge plants based on protozoan analysis. *Water Res.* 27:891–895.

Schramm, A., D. de Beer, A., Van den Heuvel, S., Ottengraf, S y Amann, R. 1999. Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by in situ hybridization and the use of microsensors. *Applied and Environmental Microbiology.* 65: 3690-3696.

Schramm, A. 2003. In Situ Analysis of Structure and Activity of Nitrifying Community in Biofilms, Aggregates, and Sediments. *Geomicrobiology Journal.* 20: 313-333.

Serrano, S., Arregui, L., Calvo, P., Salvadó, H., Zornoza, A., Fernandez, N., Rodríguez, E., Pérez-Uz, B. 2008. Comunidades de protistas asociados a plantas con eliminación de nitrógeno. V Jornadas Técnicas sobre Microbiología del Fango Activo. Sevilla, España. 30-31 Octubre, 2008.

Seviour R., Nielsen P. 2010. *Microbiology ecology of Activated Sludge.* IWA Publishing. Londres, Reino Unido.

Siegel, S. 1983. *Estadística No Paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta.* Editorial Trillas. Mexico.

Speksnijder, A., Kowalchuk, P., Roest, K y Laanbroek, H. 1998. Recovery of *Nitrosomonas*-like 16S rDNA sequence group from freshwater habitats. *Syst. Appl. Microbiol.* 21:321-330.

Stanier, R., Ingraham, J., Wheelis, M. y Painter, P. 1986. *The Microbial World.* 5ed, Prentice-Hall Englewood Cliffs, NJ.

Stanier, R., Ingraham, J., Wheelis, M. y Painter, P. 1996. *Microbiología.* 2da ed, Editorial Reverté, S.A. Barcelona, España.

Sterrit, R., Lester, J. 1988. *Microbiology for Environmental and Public Health Engineers*. E. & F.N Spon. Nueva York, Estados Unidos.

U.S EPA. 1977. *Wastewater Treatment Facilities for Sewered Small Communities*. EPA-625/1-77-009.

Vázquez-Padín, J., Figueroa, M., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L y Méndez, R. 2009. Population dynamics of nitrite oxidizers in nitrifying granules. *Water Science & Technology*. 60.10: 2529-2536.

Viedma, J. 1972. *Exposición intuitiva y problemas resueltos de Métodos Estadísticos Fundamentos y Aplicaciones*. Ediciones del Castillo. Madrid, España.

Wang, Y., Zhang, Z., Yan, M., Gao, N., Yang, J y Ren, M. 2010. Impact of operating conditions on nitrogen removal using cycling activated sludge technology (CAST). *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 45: 3, 370-376.

Wagner, M., Erhart, R., Manz, W., Amman, R., Lemmer, H., Wedl, D. y Scheleifer, K. 1994. Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 792-800.

Wagner, M., Rath, G., Amann, R., Koops, H-P y Schleifer, K-H. 1995. In situ identification of ammonia-oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiology*. 18: 251-264.

Wagner M., Rath G., Koops H.P., Flood J. and Amann R. (1996). In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Wat Sci Techn* 34: 237-244.

Wells, G., Park, H., Yeung, C., Eggleston, B., Francis, C y Criddle, C. 2009. Ammonia-oxidizing communities in a highly aerated full-scale activated sludge bioreactor: betaproteobacterial dynamics and low relative abundance of Crenarchaea. *Environmental Microbiology*. 11(9): 2310-2328.

Wesley Eckenfelder, W., Grau P. *Activated Sludge Process Design and Control: Theory and Practice*. Water Quality Management Library. Pennsylvania, Estados Unidos. 1992.

Ye, L. y Zhang, T. 2010. Estimation of nitrifier abundances in a partial nitrification reactor treating ammonium-rich saline wastewater using DGGE, T-RFLP and mathematical modeling. *Appl Microbiology Biotechnology*. 88: 1403-1412.

Yilmaz, L., Wook, D y Noguera, D. Fish probes and their design. En: Seviour R., Nielsen P. 2010. *Microbiology ecology of Activated Sludge*. p. 370-376. IWA Publishing. Londres, Reino Unido.

Young, K. 2006. The selective value of bacterial shape. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70:660-703.

Yu, T., Qi, R., Zhang, Y y Yang, M. 2010. Nitrifier characteristics in submerged membrane bioreactors under different sludge retention times. *Water Research*. 44: 2823-2830.

Zornoza, A. 2010a. *Curso Teórico-Práctico de Técnicas de Bioindicación y Control de Procesos en EDAR*. Ed. Grupo de Bioindicación de Sevilla. Valencia, España.

Zornoza A., Alonso, J., Serrano, S., Fajardo, V., Zorrilla, F., Bernácer, I., Morenilla, J. 2010b. Estudio integrado del proceso de fangos activos I. Análisis descriptivo de factores físico-químicos y biológicos implicados en su dinámica. Documentación presentada en VII Jornadas de Transferencia de Tecnología sobre Microbiología del Fango Activo. Sevilla, España.