

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Estudio integral de una estación depuradora de aguas
residuales con diseño innovador, tratamiento
secundario con eliminación biológica de nitrógeno y
reactor de membranas (MBR)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Javier Duque González

DIRECTORES

Susana Lourdes Serrano Barrero
Lucía Arregui García-Rovés



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS DOCTORAL

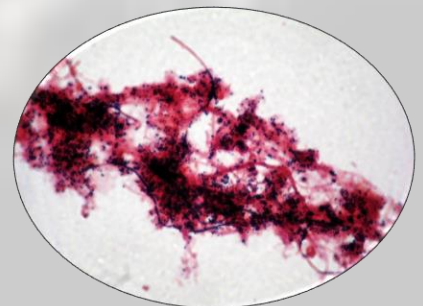
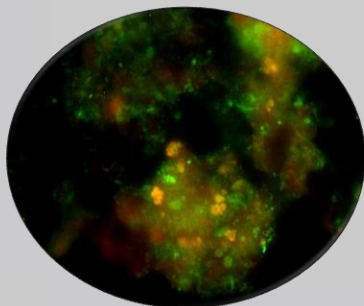
**Estudio integral de una estación depuradora de aguas
residuales con diseño innovador, tratamiento secundario
con eliminación biológica de nitrógeno y reactor de
membranas (MBR)**

JAVIER DUQUE GONZÁLEZ

Directoras

Susana Lourdes Serrano Barrero

Lucía Arregui García-Rovés



Madrid, 2022

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DOCTORADO EN MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**Estudio integral de una estación depuradora de aguas
residuales con diseño innovador, tratamiento secundario
con eliminación biológica de nitrógeno y reactor de
membranas (MBR)**

PRESENTADA POR

Javier Duque González

DIRECTORAS

Susana Lourdes Serrano Barrero

Lucía Arregui García-Rovés

"Nomine si nescis, perit et cognitio rerum"

Carl von Linné

PRÓLOGO

Antes de empezar con la lectura de este trabajo y de ahondar en todos los pormenores que lo envuelven quisiera contaros, brevemente, una historia de causalidades, y digo bien causalidades, porque como un día me contó, sentado en su despacho, el gran profesor Domingo Marquina, “en la vida hay causalidades, no casualidades”; y echando la vista atrás, me doy cuenta de que efectivamente es así, y Domingo tenía razón.

Eran los inicios de la primavera del año 2015 cuando, haciendo unas gestiones, me encontré con Julio Rodrigo, que fue mi Titulado Superior de laboratorio cuando estuve haciendo las prácticas de FCT del Ciclo de Grado Superior en Química Ambiental, en el laboratorio de Calidad de las Aguas Depuradas de Canal de Isabel II (en adelante CYII) en Majadahonda. Durante nuestro encuentro nos pusimos al día, él ya era el responsable del laboratorio y yo estaba en paro tras volver de una infructuosa aventura empresarial en tierras andaluzas. Me preguntó si me interesaría trabajar en el laboratorio, que buscaban a alguien para cubrir una vacante, a lo que yo, naturalmente, respondí que sí. Es en este preciso instante, cuando comenzó la cascada de causalidades de la cual estoy enormemente agradecido.

Meses más tarde de aquel encuentro, comencé a trabajar en el mismo laboratorio en el que realicé la FCT, y aquí la primera causalidad, la empresa no reconocía mi título de Grado en Biología como estudio superior, algo incomprensible, y exigían estar en posesión de un título oficial de Máster. En el siguiente curso académico (2015/2016) fui admitido en el Máster Universitario en Microbiología y Parasitología de la Universidad Complutense de Madrid, obteniendo mi correspondiente título en septiembre de 2016; con el que, causalidad número dos, conseguí un nuevo contrato en la misma empresa e hice nuevos contactos, conocí al que era Jefe de Área en CYII, José Suárez.

La siguiente causalidad, la tercera, fue fruto de ese nuevo contacto. Yo, que hasta la fecha ni imaginaba realizar un doctorado, se me presentó la oportunidad de hacerlo, ya que a finales de ese año 2016, se iba a poner en marcha una EDAR de características especiales, Arroyo Valenoso, sobre la cual versa mi tesis doctoral. Retomando, dado que conocía a José Suárez y él, a su vez, a la por aquel entonces Jefa de Área en CYII, María Isabel Calvo, presentándonos a mis directoras de tesis y a mí; le expusimos nuestra idea de estudio y, sin pensárselo

Prólogo

mucho, aceptó la colaboración. Se llevaron a cabo las formalidades correspondientes y, ¡a trabajar!

Fue durante los muestreos y análisis de las muestras que se tomaban cuando sobrevino la cuarta causalidad; unas estructuras parecidas a bacterias, observadas al microscopio de epifluorescencia, pero con unas tonalidades diferentes a lo esperado, nos puso sobre la pista de unas bacterias recientemente descritas pero ignotas para nosotros, las bacterias *comammox*. Este hallazgo nos trajo tanto alegrías como disgustos; alegrías por lo que implica trabajar con organismos nuevos y disgustos, por la misma razón. Tratábamos de trabajar con ellas empleando diferentes técnicas, realicé un curso adicional de técnicas de PCR, pero solo conseguíamos el mismo resultado: sin crecimiento, sin detección... la desesperación de apoderaba tanto de mí como de mis directoras.

Para más infortunios, entre finales de 2019 y principios de 2020, empezó la pandemia provocada por SARS-CoV-2; pero nuevamente, las causalidades existen, mi quinta causalidad. El haber trabajado con PCR convencional y cuantitativa, además de con secuenciación masiva para la detección de las bacterias *comammox*, así como haber realizado el curso que os comenté anteriormente, me permitió firmar un nuevo contrato con CYII, para poner a punto estas técnicas para detectar el virus SARS-CoV-2 en las aguas residuales, adquiriendo más experiencia en el ámbito de la biología molecular y empezando a trabajar en el campo de la Virología; además, durante el confinamiento, aprendía a realizar estudios multivariantes de las comunidades de microorganismos que veréis a lo largo del texto, un área del conocimiento que no tenía para nada claro y que finalmente entendí, aprendí y, por si fuera poco, me apasionó.

De este revés mundial, quiero mostrar mi respeto para todos los fallecidos y mi homenaje a todos los que participamos trabajando para combatirlo o al menos sobrellevarlo; se desprende mi sexta causalidad. Ésta proviene de la necesidad de detectar concentraciones más bajas de SARS-CoV-2 en el agua residual, para lo cual, nos trajeron al laboratorio de CYII un equipo de PCR digital; entre las diferentes pruebas que hicimos para el virus, también se hicieron para otros patógenos (es propiedad industrial, no puedo revelar esa información), realicé ensayos para la detección de bacterias nitrificantes, incluidas las *comammox*, *et voilà*, ¡detectadas y cuantificadas!; el esfuerzo de dos años al final se vio recompensado, conseguimos un resultado diferente, durante la lectura de este trabajo descubriréis más sobre este interesante tema.

Terminando mi relato, quisiera haceros ver que, aunque se sufran reveses, pérdidas de seres queridos, creación de nuevas amistades, cambio de pareja o de casa; a cada paso que damos, aunque no lo parezca, creamos nuestro destino, nuestra suerte, de todo se aprende, hay que proseguir porque al final, lo bueno, llega. Seguro que pensáis “menuda suerte que ha tenido este tío”, a lo que yo únicamente os contesto con una cita de Voltaire, “Suerte es lo que sucede cuando la preparación y la oportunidad se encuentran y fusionan”.

Espero que disfrutéis leyendo mi tesis doctoral.

AGRADECIMIENTOS

Creo que no es solo mío el sentimiento de responsabilidad al que todos los doctorandos nos enfrentamos al escribir esta sección de “La Tesis”. Y es que, en efecto, si no fuese a un gran repertorio de familiares, amigos, directoras, colegas y demás gente afín al *autor* que, con su apoyo, consejos, ayuda y enseñanzas, no podría haber llegado hoy a este momento, el de agradecer su colaboración.

En primer lugar, y aunque pueda resultar obvio, a mis padres, **Juan Ramón** y **Ana**, sin ellos nada habría sido posible, gracias a ellos puedo redactar estas líneas. Gracias por proveerme de la vida, de los medios, de la ilusión, de las ganas y de la ambición necesarias para embarcarme en el proyecto más importante que un estudiante pueda abordar. Gracias por vuestro empuje y continuo e incondicional apoyo y, como no, por vuestro amor y cariño. Yo también os quiero, y mucho.

Miguel, ¡hermano mío!, mil gracias, por tu constante apoyo, tus palabras de ánimo y tus siempre acertadas reprimendas para mantenerme siempre en mi camino, fijo en el objetivo. Gracias por quererme tanto. Sólo unos pocos somos conscientes de todas las inconmensurables concesiones que has hecho para permitir que yo llegue hasta aquí; no hay palabras ni hechos que pueda decir ni hacer jamás para igualar tu gesta. Te estaré eternamente agradecido.

Susana y **Lucía**, mis directoras, que pese a las dificultades que nos encontramos al inicio, en medio y al final que, tras salvarlas convenientemente, me habéis acompañado en mis etapas más importantes como estudiante y como persona; nos conocimos durante mi TFG, dirigisteis mi TFM, y durante los últimos años también Mi Tesis Doctoral, que también es vuestra. Gracias por el conocimiento, el apoyo, la confianza, y por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo, que era un reto, un sueño, que nunca creí poder alcanzar, y que vosotras me habéis permitido hacer realidad.

Agradecer a **Canal de Isabel II**, con **Iñaki** a la cabeza, permitirnos realizar los muestreos y poner a nuestra disposición todo lo necesario para poder llevar a cabo este trabajo de investigación. Gracias por darme la oportunidad de colaborar con vosotros, ha sido un placer.

Agradecimientos

Por supuesto, agradecer a todos los integrantes del equipo de trabajo de la **EDAR Arroyo Valenoso** por su amabilidad y hospitalidad, siempre dispuestos a colaborar y siempre con una sonrisa.

Cristina, llegaste a mitad de camino, pero has colaborado como una más, gracias por tu fuerza, coraje y determinación; por ayudarme no solo con este proyecto, si no también fuera de él, eres un grandísimo apoyo. Gracias por quererme tanto.

También quiero agradecer a **Julio y Sergio** su apoyo, el respeto y los ánimos brindados para alentarme a ofrecer siempre lo mejor de mí pero, sobre todo, agradeceros vuestra inquebrantable confianza, significa mucho para mí.

Como no, agradecer a **Luz, María Isabel y José** la ayuda prestada sobre la depuración, tanto teórica como de gestión, aclarando todas mis dudas sobre la instalación y detallando cada una de sus peculiaridades.

Esther, Irene, Miriam, María, Yolanda, Carmen, Belén, Elena, Pablo, Araceli y seguro que me dejo a muchos (que por favor me perdonen), todos ellos compañeros de “Canal” que me habéis ayudado, escuchado y apoyado durante todo este largo periodo, perdonadme si en alguna ocasión no fui amable con vosotros, sabéis que lo soy.

Domingo, Pilar, Antonio, Ana, Silvia, grandes científicos y docentes, compañeros de departamento, por animarme cada vez que nos veíamos por los pasillos y que, aunque yo no os lo contara, sabías siempre de mis progresos.

Agradecer a **Nacho y Miguel** su imprescindible apoyo técnico y conocimientos de metataxonómica, que me permitió ofrecer algo nuevo a la comunidad científica, ¡gracias, compañeros! Espero seguir aprendiendo de vosotros.

A **Pablo**, compañero de laboratorio, gran profesional y bellísima persona; gracias por los consejos dados, pero sobre todo por toda la parte no investigadora ni docente, por los buenos ratos y las charlas mantenidas.

Alex, buen compañero y amigo, no han sido demasiados, pero nuestros encuentros siempre han sido enriquecedores y de gran ayuda.

A **Casti** y a **Tania**, buenos amigos a los que todas las palabras de elogio y agradecimiento son pocas, simplemente gracias por todo, por estar ahí, por acordaros y escucharme de vez en cuando.

Gracias a **Consuelo** y a **Nuria**, por posibilitar los ensayos de PCR digital y el soporte técnico prestado.

También quiero agradecer a mi maestro de ciencias **Jesús**, todo el conocimiento sobre ciencias naturales que me enseñó, me puso sobre ese sendero que siempre seguí y continuaré siguiendo. Agradecerle también sus lecciones sobre la vida y el mundo que nos tocó vivir, eras un gran maestro y una gran persona. Gracias de todo corazón.

Por último, pero igual o más de importante, quiero agradecer **a todos aquellos que ya no están entre nosotros** y que de una forma u otra aportaron su granito de arena y dejaron huella a su paso; habéis formado parte del proyecto más importante de mi carrera como estudiante, pero más importante aún, formáis parte de mí. Siempre estaréis en mi memoria.

MUCHAS GRACIAS A TODOS

A mi hermano Miguel

“El leer ilustra”

Ramón Duque

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
ABREVIATURAS	11
RESUMEN	17
ABSTRACT	21
ÍNDICE DE TABLAS.....	25
ÍNDICE DE FIGURAS	31
1. INTRODUCCIÓN	47
1.1.Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales	48
1.2.EDAR Arroyo Valenoso	50
1.3.Tratamiento biológico: el microbioma de las EDAR.....	53
1.3.1. Protistas y micrometazoos del fango activo	54
1.3.2. Comunidad procariota del fango activo.....	56
1.3.2.1. Procariotas implicados en la eliminación biológica del nitrógeno	56
1.3.2.2. Bacterias relacionadas con el bioensuciamiento de las membranas del MBR	59
2. OBJETIVOS.....	69
3. MATERIALES Y MÉTODOS	75

Índice

3.1.Toma de Muestras	75
3.2.Procesamiento de las muestras	75
3.3.Análisis de variables fisicoquímicas	76
3.4.Cálculo del Índice de Fango.....	79
3.4.1. Características macroscópicas del fango activo.....	80
3.4.2. Características microscópicas del fango activo	80
3.5.Recuento e identificación de protistas y micrometazoos	80
3.6.Determinación de la viabilidad celular bacteriana	81
3.7.Cultivo y recuento de bacterias viables cultivables	82
3.8.Estudio de la diversidad microbiana	83
3.8.1. Comunidades de Protistas y Micrometazoos	85
3.8.1.1. Análisis univariante	87
3.8.1.2. Análisis multivariante	88
3.8.2. Dinámica poblacional de Protistas y Micrometazoos.....	92
3.8.2.1. Análisis de Correspondencia Canónica	93
3.8.3. Comunidad microbiana procariota: Metataxonomía	95
3.8.3.1. Extracción de ADN, secuenciación y procesamiento de lecturas de amplicones	95
3.8.3.2. Análisis estadísticos.....	96

3.9. Detección y cuantificación de grupos procariotas implicados en la eliminación de nitrógeno.....	97
3.9.1. Detección y cuantificación de bacterias AOB y NOB: Hibridación fluorescente in situ (FISH)	97
3.9.2. Detección y cuantificación de bacterias Comammox (y AOA)	98
3.9.2.1. Hibridación fluorescente in situ (FISH).....	98
3.9.2.2. PCR cuantitativa	101
3.9.2.3. PCR digital: bacterias comammox y AOA.....	102
3.9.2.4. Metataxonomía	104
3.10. Investigación sobre cepas bacterianas relacionadas con el bioensuciamiento de las membranas	104
3.10.1. Selección de cepas bacterianas Gram negativas	104
3.10.2. Obtención y conservación de cultivos puros de las cepas seleccionadas	105
3.10.3. Identificación molecular	105
3.10.4. Determinación de la capacidad de producción de autoinductores de tipo AHL	107
3.10.5. Ensayo de adhesión celular.....	108
4. RESULTADOS	115
4.1. Características abióticas del sistema ecológico.....	115
4.1.1. El influente.....	115

Índice

4.1.2. El efluente	116
4.1.3. Rendimiento de la depuración	117
4.1.4. Variables fisicoquímicas operacionales o de control de proceso	118
4.1.5. Variables fisicoquímicas analizadas en el biorreactor: Nitrógeno y Fósforo	120
4.2. Características bióticas del sistema ecológico	123
4.2.1. Evaluación de la calidad del fango activo del biorreactor	123
4.2.1.1. Decantabilidad del fango (V30).....	123
4.2.1.2. Características macroscópicas del fango activo.....	124
4.2.1.3. Características microscópicas del fango activo	125
4.2.1.4. Índice de fango.....	127
4.2.1.5. Estudio de la viabilidad de bacterias totales del fango activo	127
4.2.1.6. Recuento de bacterias totales viables cultivables	129
4.3. Comunidades de Protistas y Micrometazoos desarrolladas en el tratamiento biológico de la EDAR Arroyo Valenoso.....	134
4.3.1. Composición de la comunidad microbiana eucariota	134
4.3.2. Riqueza y abundancia de taxones y grupos eucariotas	136
4.3.3. Estructura de la comunidad.....	145
4.3.3.1. Heterogeneidad, uniformidad y dominancia.....	145

4.3.4. Dinámica de las comunidades eucariotas	159
4.3.4.1. Análisis de similitudes	159
4.3.4.2. Especies indicadoras	163
4.3.4.3. Análisis de agrupamiento.....	168
4.3.4.4. Escalado multidimensional no Paramétrico.....	170
4.3.4.5. Análisis de Correspondencia Canónica (CCA)	175
4.4.Comunidades procariotas desarrolladas en el tratamiento biológico de la EDAR Arroyo Valenoso	200
4.4.1. Composición y riqueza de la comunidad	202
4.4.2. Estructura de la comunidad.....	203
4.4.3. Dinámica de la comunidad	205
4.5.Estudio integral de la comunidad microbiana total presente en el reactor biológico de la EDAR Arroyo Valenoso.....	208
4.6.Detección y cuantificación de grupos procariotas implicados en la nitrificación	210
4.6.1. Detección y cuantificación de los grupos AOB y NOB	210
4.6.2. Detección y cuantificación del grupo de bacterias comammox	211
4.6.2.1. Mediante FISH.....	211
4.6.2.2. Mediante técnicas PCR: detección de los grupos procariotas comammox y AOA	212

Índice

4.6.2.3. Mediante secuenciación masiva.....	214
4.7. Bioensuciamiento de las membranas del reactor MBR	216
4.7.1. Identificación de cepas bacterianas procedentes de los aislamientos	216
4.7.2. Producción de autoinductores: acil homoserin lactonas	218
4.7.3. Capacidad de colonización de superficies: ensayo de adhesión celular	220
5. DISCUSIÓN.....	225
5.1. Depuración de las aguas residuales: Tecnología y diseño de la EDAR Arroyo Valenoso	225
5.2. Ecología del fango activo en biorreactores con sistemas MBR.....	228
5.2.1. El flóculo.....	229
5.2.2. Las comunidades microbianas del fango activo	230
5.2.2.1. Los protistas y micrometazoos	231
5.2.2.2. Los procariotas.....	238
5.2.2.3. El microbioma y sus relaciones	240
5.3. El proceso de nitrificación.....	242
5.3.1. Bacterias amonio oxidantes y bacterias nitrito oxidantes.....	243
5.3.1.1. Nitrospira comammox	244
5.4. Formación de biopelículas y comunicación celular: el problema del bioensuciamiento.....	249

6.	CONCLUSIONES	257
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	263
8.	ANEXO	301
	ÍNDICE DE TABLAS.....	301
	TABLAS.....	305

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

%. Porcentaje

μL. microlitro/s

μm. micra/s

A_{260nm}. Absorbancia medida a 260 nm de longitud de onda

A_{280nm}. Absorbancia medida a 280 nm de longitud de onda

ADN. Ácido desoxirribonucleico

ADNr. ADN ribosomal

AHL. N-acil-homoserin lactonas

AI. Autoinductores

AMO. Amonio monooxigenasa, enzima

ANOSIM. *Analysis of similarity*, Análisis de similitudes

ANOVA. *Analysis of variance*, Análisis de la varianza

AOA. *Ammonia Oxidizing Archaea*, Arqueas amonio oxidantes

AOB. *Ammonia oxidizing bacteria*, Bacterias amonio oxidantes

ARN. Ácido ribonucleico

ARNr. Ácido ribonucleico ribosomal

ASV. *Amplicon sequence variant*, Variante de secuencia del amplicón

BLAST. *Basic Local Alignment Search Tool*

C. violaceum. Chromobacterium violaceum

Ca. *Candidatus*

CAI. Centro de Apoyo a la Investigación

CCA. *Canonical Correspondence Analysis*, Análisis de Correspondencia Canónica

Comammox. *Complete ammonia oxidation*, Oxidación completa del amonio

CV. cristal violeta

d. día

DBO₅. Demanda Biológica de Oxígeno a los cinco días

DO. densidad óptica

dPCR. *digital PCR*, PCR digital

DQO. Demanda Química de Oxígeno

Dr. Doctor

EDAR. Estación depuradora de aguas residuales

Abreviaturas

EDTA. *Ethylendiaminetetraacetic acid*, ácido de etilendiamiotetraacético

Ef. Edad del fango

EN. *European Norm*, Norma Europea

ENAC. Entidad Nacional de Acreditación

ETAP. Estación de Tratamiento de Aguas Potables

FAM. Carboxifluoresceína , Carboxifluoresceína

FCT. Formación en Centros de Trabajo

FISH. *Fluorescent in situ hybridization*, hibridación fluorescente *in situ*

g. gramo/s

h. hora/s

H₀. Hipótesis nula

HAO. Hidroxilamina monooxigenasa, enzima

he. Habitantes equivalentes

IEC. *International Electrotechnical Commission*, Comisión Electrotécnica Internacional

IF. Índice de fango

ind. individuos/s

ind/mL. individuos/mililitro

IndVal. *Indicator species analysis*, Valor indicador, Análisis de especies indicadoras

IP. Ioduro de Propidio

ISO. *International Organization for Standardization*, Organización Internacional para la Estandarización

kg. kilogramo

L. litro

LB. Luria Bertani, medio de cultivo

ln. logaritmo neperiano o natural

log. logaritmo decimal

M. Molar, Molaridad

m³. metro/s cúbico/s

MBR. *Membrane Bioreactor*, Reactor biológico de membranas

mg. miligramo

min. minuto/s

mm. milímetro/s

MQS. Moléculas de *Quorum Sensing*

N. Nitrógeno

N₂O. Óxido nitroso

NCBI. *National Center for Biotechnology Information*

ng. nanogramo/s

NGS. *Next Generation Sequencing*, Secuenciación de nueva generación

NH₄⁺. Ión amonio

nm. nanómetro/s

nMDS. *non-metric multidimensional scaling*, Escalamiento multidimensional no métrico

N-NH₄⁺. Nitrógeno de amonio

N-NO₂⁻. Nitrógeno de nitritos

N-NO₃⁻. Nitrógeno de nitratos

NO₂⁻. Ión nitrito

NO₃⁻. Ión nitrato

NOB. *Nitrite oxidizing bacteria*, Bacterias nitrito oxidantes

NT. Nitrógeno total

°C. Grado/s Celsius

OHSAS. *Occupational Health and Safety Assesment Series*, Sistemas de Gestión de la Salud y la Seguridad Ocupacional

OTU. *Operational taxonomic unit*, Unidad taxonómica operacional

P. Fósforo

PAST. *Paleontological Statistics*

pb. par/es de base/s

PCR. *Polymerase chain reaction*, Reacción en cadena de la polimerasa

PERMANOVA. *Permutational multivariate analysis of variance*, Análisis permutacional multivariante de la varianza

PSIA. *Pseudomonas selective isolation agar*, Agar para el aislamiento selectivo de *Pseudomonadaceae*, medio de cultivo

PT. Fósforo total

PTM. *Presión transmembrana*

QS. *Quorum Sensing*

RD. Real Decreto

RDA. *Redundancy Analysis*, Análisis de Redundancia

rpm. revoluciones por minuto

rtqPCR. *real time Quantitative Polimerase Chain Reaction*, PCR cuantitativa en tiempo real

s. segundo/s

Abreviaturas

SDS. *Sodium dodecyl sulfate*, dodecilsulfato sódico

seg. segundo/s

SIMPER. *Similarity percentage*, Porcentaje de similitud

sNOB. *strict nitrite-oxidizing bacteria*, bacterias nitrito oxidantes estrictas

sp. especie

SS. Sólidos en suspensión

SSLM. *Sólidos en suspensión del licor mezcla*

SST. Sólidos en suspensión totales

SSVLM. *Sólidos en suspensión volátiles del licor mezcla*

T^a. Temperatura

TAE. Tris acetato-EDTA

Tamra. Tetrametilrodamina

Taq. *Thermus aquaticus*

TON. *Total oxidable nitrogen*, Nitrógeno total oxidable

TRC. Tiempo de retención celular

TRH. Tiempo de retención hidráulico

TSA. *Tryptone Soya Agar*, Agar Tripticaseína soja, medio de cultivo

UCM. Universidad Complutense de Madrid

UFC. Unidad/es formadora/s de colonia/s

UNE. Una Norma Española

UNF. Unidades nefelométricas de formacina

UPGMA. *Unweighted pair-group average*, Análisis de pares de grupos no ponderados

VRBG. Violet red bile glucose agar, Agar Bilis Glucosa cristal violeta y rojo neutro, medio de cultivo

W. watio/s

α . alfa; nivel de significación

RESUMEN

RESUMEN

El agua es la base de la actividad tanto biótica como abiótica, es esencial para la vida, y puede considerarse como un recurso renovable. El agua se extrae de medios naturales y es utilizada para el beneficio del ser humano, pero este uso del agua por el hombre ha producido un deterioro progresivo en su calidad ecológica y sanitaria. La utilización de sistemas de depuración avanzados permite obtener aguas depuradas de mayor calidad y facilita su reutilización para las actividades humanas, lo que ha ayudado a evitar el deterioro de los ecosistemas, siendo éste un objetivo prioritario en la actualidad.

El conocimiento de las comunidades de microorganismos presentes en los tratamientos biológicos de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) así como de las relaciones que se establecen entre ellas y su ambiente abiótico resulta fundamental para poder realizar un manejo correcto de este tipo de instalaciones. Estas actuaciones abarcan tanto los procedimientos puramente tecnológicos del proceso, como la comprensión de los procesos (micro) biológicos esenciales para la eliminación de contaminantes y cuyos responsables son, además, útiles como herramienta de control, principalmente, como bioindicadores.

El presente trabajo se realizó en las innovadoras instalaciones de la EDAR Arroyo Valenoso (Boadilla del Monte, Madrid) que está dotada con un sistema de ultrafiltración de tipo MBR sumergido. Esta EDAR cuenta con unas infraestructuras y un diseño de depuración avanzados, obteniéndose un agua depurada de alta calidad y que además contribuye a la restauración ecológica del cauce receptor.

Se realizaron muestreos durante un periodo de veinticuatro meses, coincidiendo con la etapa de puesta en marcha de la planta, siendo objetivos del estudio la caracterización del agua residual en todas las fases del proceso de depuración, la identificación y el análisis de las comunidades de microorganismos (protistas, micrometazoos y procariotas) desarrolladas en el tratamiento secundario y la investigación de las relaciones existentes entre las fracciones abiótica y biótica para la determinación de posibles microorganismos bioindicadores de control de proceso. Asimismo, se determinó la importancia de distintas poblaciones de bacterias nitrificantes, así como de otras bacterias implicadas en el proceso de bioensuciamiento de las membranas de filtración.

Para la consecución de los datos, tanto abióticos como bióticos, se emplearon una amplia variedad de técnicas analíticas como, por ejemplo, la espectrofotometría, la potenciometría, los

Resumen

cultivos celulares, la hibridación fluorescente *in situ* (FISH), la secuenciación masiva, o distintas variantes de la PCR, entre otras. Los resultados obtenidos fueron posteriormente tratados con diversos programas estadísticos para determinar la dinámica poblacional y establecer la relación entre los distintos parámetros examinados.

Se verificó la elevada capacidad de depuración de la instalación y la obtención de un efluente de alta calidad y se identificaron nuevos protistas bioindicadores relacionados con la estacionalidad, como *Vorticella striata* y *Peranema* sp o con el proceso de nitrificación, como *Trochilia minuta*, *Entosiphon* sp o *Litonotus* sp. Además, gracias a la avanzada tecnología de la PCR digital fue posible la detección y cuantificación de los diferentes grupos de procariotas nitrificantes presentes en el fango activo, incluyendo a la arqueas oxidantes del amonio (AOA) o el grupo de las bacterias *comammox*, pertenecientes al género *Nitrospira*, y cuya abundancia relativa fue más importante de lo esperado según las referencias existentes. Los resultados obtenidos mediante secuenciación masiva del gen *ADNr 16s* y computarizados mediante diversos programas y modelos matemáticos, permitieron determinar la evolución de la comunidad bacteriana durante el periodo de estudio, así como establecer una red de correlaciones entre esta comunidad y la comunidad de protistas y micrometazoos, suponiendo un avance en el conocimiento de la dinámica de comunidades en las EDAR con sistemas de fangos activos. Asimismo, se identificaron algunas de las bacterias que potencialmente podrían dar lugar a problemas de bioensuciamiento por su alta capacidad de formación de biopelículas sobre las membranas de ultrafiltración.

En este trabajo se pone en relieve la importancia de la realización estudios detallados y diversos sobre las comunidades de microorganismos implicadas en la depuración de las aguas residuales, no sólo con el objetivo de aportar nuevo conocimiento a la ciencia, sino también para fomentar la formación y el conocimiento entre los operadores y técnicos que trabajan en las EDAR, mejorar la eficiencia de las plantas y disminuir los costes de operación mediante, por ejemplo, el empleo de condiciones de aireación más apropiadas para la eliminación de nutrientes o de estrategias biológicas que sustituyan el uso innecesario de reactivos químicos o que incrementen la vida media de las membranas de ultrafiltración en el reactor biológico.

Palabras clave: EDAR, MBR, comunidades microbianas, protistas, bioindicadores, PCR digital, *comammox*, bioensuciamiento.

ABSTRACT

ABSTRACT

Water is the basis of both biotic and abiotic activity, it is essential for life, and it can be considered as a renewable resource. Water is extracted from natural sources and is used for the benefit of human beings, but this use of water by humans has produced a progressive deterioration in its ecological and sanitary quality. The use of advanced purification systems allows higher quality purified water to be obtained and facilitates its reuse for these human activities, which has helped prevent the deterioration of ecosystems, being a priority objective today.

The knowledge of the communities of microorganisms presents in the biological treatments of wastewater treatment plants (WWTP) as well as the relationships established between them and their abiotic environment is essential to be able to carry out a correct management of this type of facilities. These actions cover both the purely technological procedures of the process and the understanding of the (micro) biological processes essential for the elimination of contaminants and whose responsible are, moreover, useful as a control tool, mainly as bioindicators.

The present work was carried out in the innovative facilities of the Arroyo Valenoso WWTP (Boadilla del Monte, Madrid), which is equipped with a submerged MBR-type ultra-filtration system. This WWTP has advanced infrastructures and treatment design, obtaining high-quality purified water that also contributes to the ecological restoration of the riverbed.

Samplings were carried out during a period of twenty-four months, coinciding with the start-up stage of the plant, the objectives of the study being the characterization of the wastewater in all phases of the purification process, the identification and analysis of the communities of microorganisms (protists, micrometazoan and prokaryotes) developed in the secondary treatment and the investigation of the existing relationships between the abiotic and biotic fractions for the determination of possible bioindicator microorganisms for process control. Likewise, the importance of different populations of nitrifying bacteria, as well as other bacteria involved in the biofouling process of the filtration membranes, was determined.

A wide variety of analytical techniques were used to obtain the data, both abiotic and biotic, such as spectrophotometry, potentiometry, cell cultures, fluorescent in situ hybridization (FISH), massive sequencing, or different variants of the PCR, among others. The results

Abstract

obtained were subsequently treated with various statistical programs to determine the population dynamics and establish the relationship between the different parameters examined.

The high purification capacity of the facility and the obtaining of a high-quality effluent were verified and new bioindicator protists related to seasonality, such as *Vorticella striata* and *Peranema* sp or to the nitrification process, such as *Trochilia minuta*, *Entosiphon* sp or *Litonotus* sp. In addition, it was possible to detect and quantify the different groups of nitrifying prokaryotes present in the activated sludge thanks to the advanced technology of digital PCR, including the ammonium-oxidizing archaea (AOA) or the group of comammox bacteria, belonging to the genus *Nitrospira*, and whose relative abundance was more important than expected according to existing references. The results obtained by massive sequencing of the 16s rDNA gene and computerized using various programs and mathematical models, allowed determining the evolution of the bacterial community during the study period, as well as establishing a network of correlations between this community and the community of protists and micrometazoan, assuming an advance in the knowledge of the dynamics of communities in WWTPs with activated sludge systems. Likewise, some of the bacteria that could potentially give rise to biofouling problems due to their high capacity to form biofilms on ultrafiltration membranes were identified.

This work highlights the importance of carrying out detailed and diverse studies on the communities of microorganisms involved in the treatment of wastewater, not only with the aim of providing new knowledge to science, but also to promote training and knowledge among the operators and technicians who work in the WWTP, improve the efficiency of the plants and reduce operating costs through, for example, the use of more appropriate aeration conditions for the removal of nutrients or biological strategies that replace the unnecessary use of chemical reagents or that increase the average life of the ultrafiltration membranes in the biological reactor.

Keywords: WWTP, MBR, microbial communities, protists, bioindicators, digital PCR, comammox, biofouling.

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

1. INTRODUCCIÓN	47
Tabla 1.1: Contaminantes presentes en un agua residual y sus posibles efectos sobre el medio receptor. Fuente: (Knobelsdorf, 2005).	49
3. MATERIALES Y MÉTODOS	75
Tabla 3.1: Parámetros fisicoquímicos analizados para cada conjunto de variables, así como las técnicas empleadas para su determinación.	78
Tabla 3.2: Características macroscópicas y microscópicas del fango activo consideradas para el cálculo del IF.	79
Tabla 3.3: Sondas FISH empleadas para la detección de bacterias comammox. El asterisco (*) indica que la nomenclatura de la sonda se realiza acorde a Alm y colaboradores (Alm et al., 1996).	99
Tabla 3.4: Dianas amplificadas mediante la técnica de PCR digital.....	103
4. RESULTADOS.....	115
Tabla 4.1: Media, desviación estándar (DE) y rango de las variables fisicoquímicas analizadas del influente.	115
Tabla 4.2: Media, desviación estándar (DE) y rango de las variables fisicoquímicas analizadas del efluente.	116
Tabla 4.3: Media, desviación estándar (DE) y rango de los rendimientos de depuración obtenidos de los parámetros contemplados en el RD 509/1996.....	118

Índice de Tablas

Tabla 4.4: Media, desviación estándar (DE) y rango de las variables operacionales analizadas.	119
Tabla 4.5: Media, desviación estándar (DE) y rango de las variables Nutrientes en la cámara anóxica.....	120
Tabla 4.6: Media, desviación estándar (DE) y rango de las variables Nutrientes en la cámara aeróbica.....	121
Tabla 4.7: Media, desviación estándar (DE) y rango de las variables Nutrientes en el reactor MBR.....	122
Tabla 4.8: Media, desviación estándar (DE) y rango de decantabilidad obtenidos para cada compartimento del biorreactor en los 18 muestreos realizados.	123
Tabla 4.9: Categoría predominante asignada a las características macroscópicas del fango activo para los compartimentos analizados.....	125
Tabla 4.10: Resumen de las características microscópicas obtenidas para los tres compartimentos del biorreactor.....	126
Tabla 4.11: Media y desviación estándar (DE) de IF obtenido para cada reactor biológico. A: cámara anóxica; B: cámara aeróbico; C: reactor MBR.....	127
Tabla 4.12: Valores de recuento promedio y desviación estándar (DE) obtenido en cada reactor a partir de la siembra de bacterias en el medio de cultivo LB.	129
Tabla 4.13: Valores de recuento promedio y desviación estándar (DE) obtenido en cada reactor a partir de la siembra de bacterias en el medio de cultivo VRBG.	130
Tabla 4.14: Valores de recuento promedio y desviación estándar (DE) obtenido en cada reactor a partir de la siembra de bacterias en el medio de cultivo PSIA.....	131

Tabla 4.15: Recuento, media y desviación estándar (DE), en UFC/L, de bacterias heterótrofas viables procedentes del raspado de la membrana para los distintos medios de cultivo empleados.....	133
Tabla 4.17: Resultados del análisis SIMPER. Contribución de especies a la disimilitud entre las estaciones en la cámara anóxica. Md: media de disimilitud, Contrib: porcentaje de contribución de cada taxón a la disimilitud en el compartimento.....	160
Tabla 4.18: Resultados de SIMPER. Contribución de especies a la disimilitud entre las estaciones en la cámara aeróbica. Md: media de disimilitud, Contrib: porcentaje de contribución de cada taxón a la disimilitud en el compartimento.....	161
Tabla 4.19: Resultados de SIMPER. Contribución de especies a la disimilitud entre las estaciones en el reactor MBR. Md: media de disimilitud, Contrib: porcentaje de contribución de cada taxón a la disimilitud en el compartimento.....	162
Tabla 4.20: Esquema de la distribución de los diferentes elementos incluido en una de las electroforesis realizadas durante este trabajo.....	217
Tabla 4.21: Identificación de las cepas procedentes del raspado de las membranas del reactor MBR y su código correspondiente en la base de datos del NCBI. El asterisco (*) indica que es una cepa sin identificar.....	218
Tabla 4.22: Resultados del ensayo realizado para la detección de la producción de autoinductores (AHL). El signo (+) indica que se observa producción de violaceína por parte de la cepa biosensora y el signo (-) que no se observa producción de violaceína.	219
Tabla 4.23: Clasificación de cepas según su capacidad de adherencia a la superficie ensayada conforme al valor de blanco obtenido.	220

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN	47
Figura 1.1: Técnicas de separación para retener partículas en suspensión. Fuente: https://condorchem.com/es/blog/metodos-de-separacion-de-aguas-residuales/	50
Figura 1.2: Representación esquemática de la línea de agua 1 de la EDAR Arroyo Valenoso.	52
Figura 1.3: Representación esquemática de las etapas de oxidación del amonio y del nitrito realizada por las bacterias AOB y NOB.....	57
Figura 1.4: Representación esquemática del proceso de bioensuciamiento en un sistema MBR (kDa, kiloDalton). Fuente: (Hong et al., 2018).	60
Figura 1.5: Formación de la biopelícula: se muestran las cuatro etapas principales de la formación de una biopelícula.	61
Figura 1.6: Esquema de inducción de la activación de genes mediante AHL. Adaptado de Yin y colaboradores (Yin et al., 2012).	63
4. RESULTADOS	115
Figura 4.1: Fotografía del resultado de la decantabilidad (V30) de una de las muestras tomadas en la cámara aeróbica.....	124
Figura 4.2: Microfotografía tomadas a 1000x. Imágenes de protistas y micrometazoos observados en el reactor biológico. A: <i>Vorticella convallaria</i> ; B: Rotífero; C: <i>Epistylis</i> sp; D: Ameba desnuda de tamaño entre 20 y 50 micras.	126

Índice de Figuras

Figura 4.3: Proporción de bacterias viables (v) en verde, y no viables (nv) en rojo, en cada uno de los tres reactores biológicos del tratamiento secundario de la EDAR Arroyo Valenoso: anox: cámara anóxica; aer: cámara aeróbica y mbr: reactor mbr..... 128

Figura 4.4: Microfotografías correspondientes a células marcadas presentes en los flóculos. Determinación de la viabilidad celular de bacterias totales. En verde, células viables marcadas con Syto9; en rojo, células no viables marcadas con IP. **A**, imagen perteneciente a un flóculo de la cámara anóxica de la muestra 12 a 1000x aumentos; **B**, imagen perteneciente a un flóculo de la cámara aeróbica de la muestra 3 a 1000x aumentos..... 128

Figura 4.5: Abundancia de bacterias totales viables cultivables en cada reactor biológico. Los puntos muestran valores considerados fuera de grupo (outliers), con diferencias de más de 1,5 veces la desviación estándar. 130

Figura 4.6: Abundancia de enterobacterias viables cultivables en cada reactor biológico. Los puntos muestran valores considerados fuera de grupo (outliers), con diferencias de más de 1,5 veces la desviación estándar. 131

Figura 4.7: Abundancia de pseudomonadáceas viables cultivables en cada reactor biológico. Los puntos muestran valores considerados fuera de grupo (outliers), con diferencias de más de 1,5 veces la desviación estándar. 132

Figura 4.8: Proporción de enterobacterias (cultivadas en medio VRBG) y pseudomonadáceas (cultivadas en medio PSIA) respecto del total de bacterias heterótrofas viables cultivables (cultivadas en medio LB) en cada uno de los compartimentos del reactor biológico. 133

Figura 4.9: Abundancia absoluta de individuos para los diferentes grupos de protistas y micrometazoos presentes en el tratamiento biológico..... 134

Figura 4.10: Proporción relativa de individuos para los diferentes grupos de protistas y micrometazoos identificados en el biorreactor de la EDAR Arroyo Valenoso. 135

Figura 4.11: Número de taxones para los diferentes grupos de protistas y micrometazoos identificados en el biorreactor de la EDAR Arroyo Valenoso. 136

Figura 4.12: Proporción relativa de taxones para los diferentes grupos de protistas y micrometazoos identificados en el biorreactor de la EDAR Arroyo Valenoso.	136
Figura 4.13: Promedio de abundancia (número de individuos/mL) para cada taxón de protistas y micrometazoos identificados en la cámara anóxica.....	138
Figura 4.14: Frecuencia de aparición para cada taxón de protistas y micrometazoos identificados en la cámara anóxica.....	139
Figura 4.15: Valores promedio de número de individuos/mL para cada taxón de protistas y micrometazoos identificados en la cámara aeróbica.	140
Figura 4.16: Frecuencia de aparición para cada taxón de protistas y micrometazoos identificados en la cámara aeróbica.	141
Figura 4.17: Promedio de número de individuos para cada taxón de protistas y micrometazoos identificados en el reactor MBR.	143
Figura 4.18: Frecuencia relativa de aparición para cada taxón de protistas y micrometazoos identificados en el reactor MBR.	144
Figura 4.19: Relación de riqueza, heterogeneidad y equidad (SHE) para los datos de los protistas y micrometazoos en la cámara anóxica. En amarillo se muestra la riqueza específica (Ln S); en azul la heterogeneidad (índice de Shannon-Wiener, H’); en verde se muestra la uniformidad (Ln E).....	146
Figura 4.20: Estudio, en la cámara anóxica, de la evolución de la dominancia, en azul; y el índice de diversidad de Simpson, en naranja, para el periodo de muestreo.....	147
Figura 4.21: Relación de riqueza, heterogeneidad y equidad (SHE) para los datos de los protistas y micrometazoos en la cámara aeróbica. En amarillo se muestra la riqueza específica (Ln S); en azul la heterogeneidad (índice de Shannon-Wiener, H’); en verde se muestra la uniformidad (Ln E).....	148

Índice de Figuras

Figura 4.22: Estudio, en la cámara aeróbica, de la evolución de la dominancia, en azul; y el índice de diversidad de Simpson, en naranja, para el periodo de muestreo. 148

Figura 4.23: Relación de riqueza, heterogeneidad y equidad (SHE) para los datos de los protistas y micrometazoos en el reactor MBR. En amarillo se muestra la riqueza específica ($\ln S$); en azul la heterogeneidad (índice de Shannon-Wiener, H'); en verde se muestra la uniformidad ($\ln E$)..... 149

Figura 4.24: Estudio, en el reactor MBR, de la evolución de la dominancia, en azul; y el índice de diversidad de Simpson, en naranja, para el periodo de muestreo. 150

Figura 4.25: Correlación de valores de diversidad alfa calculada como Índice de Shannon en los tres compartimentos, A: Cámara anóxica; B: Cámara aeróbica; C: Reactor MBR; con los parámetros fisicoquímicos analizados en el influente. Cada parámetro queda identificado en el título del eje horizontal de cada gráfico de dispersión. La línea discontinua muestra la tendencia. 151

Figura 4.26: Correlación de valores de diversidad alfa calculada como índice de Shannon en los tres compartimentos, A: Cámara anóxica; B: Cámara aeróbica; C: Reactor MBR; con los parámetros fisicoquímicos analizados en el influente. Cada parámetro queda identificado en el título del eje horizontal de cada gráfico de dispersión. La línea discontinua muestra la tendencia. 152

Figura 4.27: Correlación de valores de diversidad alfa calculada como Índice de Shannon en los tres compartimentos, A: Cámara anóxica; B: Cámara aeróbica; C: Reactor MBR; con el nitrógeno de amonio ($N-NH_4^+$) analizado en el influente. La línea discontinua muestra la tendencia. 152

Figura 4.28: Correlación de valores de diversidad alfa calculada como índice de Shannon en los tres compartimentos, A: Cámara anóxica; B: Cámara aeróbica; C: Reactor MBR; con los parámetros fisicoquímicos analizados en el influente. Cada parámetro queda identificado en el título del eje horizontal de cada gráfico de dispersión. La línea discontinua muestra la tendencia. 153

Figura 4.29: Correlación de valores de diversidad alfa calculada como índice de Shannon en los tres compartimentos, A: Cámara anóxica; B: Cámara aeróbica; C: Reactor MBR; con los parámetros fisicoquímicos analizados en el influente. Cada parámetro queda identificado en el título del eje horizontal de cada gráfico de dispersión. La línea discontinua muestra la tendencia. 154

Figura 4.30: Correlación de valores de diversidad alfa calculada como Índice de Shannon en los tres compartimentos, A: Cámara anóxica; B: Cámara aeróbica; C: Reactor MBR; con el fósforo total (PT) analizado en el influente. La línea discontinua muestra la tendencia. 154

Figura 4.31: Correlación de valores de diversidad alfa calculada como Índice de Shannon en los tres compartimentos, A: Cámara anóxica; B: Cámara aeróbica; C: Reactor MBR; con el pH analizado del efluente. La línea discontinua muestra la tendencia. 155

Figura 4.32: Correlación de valores de diversidad alfa calculada como Índice de Shannon en los tres compartimentos, A: Cámara anóxica; B: Cámara aeróbica; C: Reactor MBR; con los parámetros SSLM y SSVLM. Cada parámetro queda identificado en el título del eje horizontal de cada gráfico de dispersión. La línea discontinua muestra la tendencia. .
..... 156

Figura 4.33: Correlación de valores de diversidad alfa calculada como Índice de Shannon en los tres compartimentos, A: Cámara anóxica; B: Cámara aeróbica; C: Reactor MBR; respecto a la V30. La línea discontinua muestra la tendencia. 156

Figura 4.34: Correlación de valores de diversidad alfa calculada como Índice de Shannon en los tres compartimentos, A: Cámara anóxica; B: Cámara aeróbica; C: Reactor MBR; respecto al pH. La línea discontinua muestra la tendencia. 156

Figura 4.35: Correlación de valores de diversidad alfa calculada como Índice de Shannon en los tres compartimentos, A: Cámara anóxica; B: Cámara aeróbica; C: Reactor MBR; con los parámetros temperatura y TRH. Cada parámetro queda identificado en el título del eje horizontal de cada gráfico de dispersión. La línea discontinua muestra la tendencia. .
..... 157

Índice de Figuras

Figura 4.36: Correlación de valores de diversidad alfa calculada como Índice de Shannon en los tres compartimentos, A: Cámara anóxica; B: Cámara aeróbica; C: Reactor MBR; respecto al TRC. La línea discontinua muestra la tendencia..... 157

Figura 4.37: Correlación de valores de diversidad alfa calculada como índice de Shannon en la cámara anóxica con los parámetros fisicoquímicos operacionales. Cada parámetro queda identificado en el título del eje horizontal de cada gráfico de dispersión. La línea discontinua muestra la tendencia. 158

Figura 4.38: Correlación de valores de diversidad alfa calculada como índice de Shannon en la cámara aeróbica; con los parámetros fisicoquímicos operacionales. Cada parámetro queda identificado en el título del eje horizontal de cada gráfico de dispersión. La línea discontinua muestra la tendencia. 158

Figura 4.39: Diagrama IndVal de especies indicadores en la cámara anóxica. En el eje de ordenadas se representan las estaciones, mientras que en abscisas se muestran los taxones. Los recuadros señalan las especies indicadoras. Las especies se muestran codificadas, la Tabla 8.21 del Anexo muestra la correspondencia entre código y especie. 164

Figura 4.40: Diagrama IndVal de especies indicadores en la cámara aeróbica. En el eje de ordenadas se representan las estaciones, mientras que en abscisas se muestran los taxones. Los recuadros señalan las especies indicadoras. Las especies se muestran codificadas, la Tabla 8.21 del Anexo muestra la correspondencia entre código y especie. 166

Figura 4.41: Diagrama IndVal de especies indicadores en el reactor MBR. En el eje de ordenadas se representan las estaciones, mientras que en abscisas se muestran los taxones. Los recuadros señalan las especies indicadoras. Las especies se muestran codificadas, la Tabla 8.21 del Anexo muestra la correspondencia entre código y especie. 167

Figura 4.42: Dendrograma de asociación entre la similitud de la abundancia de especies a lo largo del periodo de estudio. Los muestreos en verde corresponden a la primavera, en rojo al verano, el marrón al otoño y el azul al invierno. Los compartimentos se identifican como: ANOX: cámara anóxica; AER: cámara aeróbica y MBR: reactor MBR. Los números hacen referencia a cada una de las muestras. 169

Figura 4.43: NMDS de la representación espacial en 3D de la cámara anóxica. Muestra las similitudes y diferencias entre grupos de muestreo según las estaciones.....	171
Figura 4.44: NMDS de la representación espacial en 2D de la cámara aeróbica. Muestra las similitudes y diferencias entre grupos de muestreo según las estaciones.....	172
Figura 4.45: NMDS de la representación espacial en 3D del reactor MBR. Muestra las similitudes y diferencias entre grupos de muestreo según las estaciones.	174
Figura 4.46: Identificación de los sectores del ordenamiento CCA.....	175
Figura 4.47: Triplot del CCA de la cámara anóxica de la abundancia de especies de protistas y micrometazoos clasificadas como abundantes y los muestreos realizados. Se representan los dos primeros vectores. Las variables fisicoquímicas del efluente se representan mediante vectores. Las especies se muestran codificadas, la Tabla 8.23 del Anexo muestra la correspondencia entre código y especie. Los colores de cada grupo son: verde, rojo, marrón y azul para la primavera, el verano, el otoño y el invierno respectivamente.....	177
Figura 4.48: Triplot del CCA de la cámara aeróbica de la abundancia de especies de protistas y micrometazoos clasificadas como abundantes y los muestreos realizados. Se representan los dos primeros vectores. Las variables fisicoquímicas del efluente se representan mediante vectores. Las especies se muestran codificadas, la Tabla 8.23 del Anexo muestra la correspondencia entre código y especie. Los colores de cada grupo son: verde, rojo, marrón y azul para la primavera, el verano, el otoño y el invierno respectivamente.....	179
Figura 4.49: Triplot del CCA del reactor MBR de la abundancia de especies de protistas y micrometazoos clasificadas como abundantes y los muestreos realizados. Se representan los dos primeros vectores. Las variables fisicoquímicas del efluente se representan mediante vectores. Las especies se muestran codificadas, la Tabla 8.23 del Anexo muestra la correspondencia entre código y especie. Los colores de cada grupo son: verde, rojo, marrón y azul para la primavera, el verano, el otoño y el invierno respectivamente.	181

Índice de Figuras

Figura 4.50: Triplot del CCA de la cámara anóxica de la abundancia de especies de protistas y micrometazoos clasificadas como abundantes y los muestreos realizados. Las variables fisicoquímicas del efluente se representan mediante vectores. Las especies se muestran codificadas, la Tabla 8.23 del Anexo muestra la correspondencia entre código y especie. Los colores de cada grupo son: verde, rojo, marrón y azul para la primavera, el verano, el otoño y el invierno respectivamente. 183

Figura 4.51: Triplot del CCA de la cámara aeróbica de la abundancia de especies de protistas y micrometazoos clasificadas como abundantes y los muestreos realizados. Las variables fisicoquímicas del efluente se representan mediante vectores. Las especies se muestran codificadas, la Tabla 8.23 del Anexo muestra la correspondencia entre código y especie. Los colores de cada grupo son: verde, rojo, marrón y azul para la primavera, el verano, el otoño y el invierno respectivamente. 185

Figura 4.52: Triplot del CCA del reactor MBR de la abundancia de especies de protistas y micrometazoos clasificadas como abundantes y los muestreos realizados. Las variables fisicoquímicas del efluente se representan mediante vectores. Las especies se muestran codificadas, la Tabla 8.23 del Anexo muestra la correspondencia entre código y especie. Los colores de cada grupo son: verde, rojo, marrón y azul para la primavera, el verano, el otoño y el invierno respectivamente. 187

Figura 4.53: Triplot del CCA de la cámara anóxica de la abundancia de especies de protistas y micrometazoos clasificadas como abundantes y los muestreos realizados. Las variables fisicoquímicas operacionales se representan mediante vectores. Las especies se muestran codificadas, la Tabla 8.23 del Anexo muestra la correspondencia entre código y especie. Los colores de cada grupo son: verde, rojo, marrón y azul para la primavera, el verano, el otoño y el invierno respectivamente. 189

Figura 4.54: Triplot del CCA de la cámara aeróbica de la abundancia de especies de protistas y micrometazoos clasificadas como abundantes y los muestreos realizados. Las variables fisicoquímicas operacionales se representan mediante vectores. Las especies se muestran codificadas, la Tabla 8.23 del Anexo muestra la correspondencia entre código y especie. Los colores de cada grupo son: verde, rojo, marrón y azul para la primavera, el verano, el otoño y el invierno respectivamente. 191

Figura 4.55: Triplot del CCA del reactor MBR de la abundancia de especies de protistas y micrometazoos clasificadas como abundantes y los muestreos realizados. Las variables fisicoquímicas operacionales se representan mediante vectores. Las especies se muestran codificadas, la Tabla 8.23 del Anexo muestra la correspondencia entre código y especie. Los colores de cada grupo son: verde, rojo, marrón y azul para la primavera, el verano, el otoño y el invierno respectivamente..... 193

Figura 4.56: Triplot del CCA de la cámara anóxica de la abundancia de especies de protistas y micrometazoos clasificadas como abundantes y los muestreos realizados. Las variables fisicoquímicas del reactor (nutrientes) se representan mediante vectores. Las especies se muestran codificadas, la Tabla 8.23 del Anexo muestra la correspondencia entre código y especie. Los colores de cada grupo son: verde, rojo, marrón y azul para la primavera, el verano, el otoño y el invierno respectivamente. 195

Figura 4.57: Triplot del CCA de la cámara aeróbica de la abundancia de especies de protistas y micrometazoos clasificadas como abundantes y los muestreos realizados. Las variables fisicoquímicas del reactor (nutrientes) se representan mediante vectores. Las especies se muestran codificadas, la Tabla 8.23 del Anexo muestra la correspondencia entre código y especie. Los colores de cada grupo son: verde, rojo, marrón y azul para la primavera, el verano, el otoño y el invierno respectivamente. 197

Figura 4.58: Triplot del CCA del reactor MBR de la abundancia de especies de protistas y micrometazoos clasificadas como abundantes y los muestreos realizados. Las variables fisicoquímicas del reactor (nutrientes) se representan mediante vectores. Las especies se muestran codificadas, la Tabla 8.23 del Anexo muestra la correspondencia entre código y especie. Los colores de cada grupo son: verde, rojo, marrón y azul para la primavera, el verano, el otoño y el invierno respectivamente. 199

Figura 4.59: Gráfico NMDS de la evolución de las comunidades bacterianas para los tres compartimentos del tratamiento biológico de la EDAR Arroyo Valenoso; se representan los dos primeros ejes. Los círculos corresponden a las muestras del primer año de muestreo y los triángulos al segundo. Aer: cámara aeróbica, en naranja; Anox: cámara anóxica, en verde y MBR. Reactor MBR en azul. 201

Índice de Figuras

Figura 4.60: Abundancia relativa de los filos dominantes de bacterias del reactor biológico de la EDAR estudiada. 202

Figura 4.61: Diversidad alfa de la comunidad procariota medida como la serie de Hill hasta D2. En el eje de abscisas se representan los muestreos y en el eje de ordenadas la diversidad. **A:** D0 = número total de especies (S); **B:** D1 = número de especies abundantes = e^H ; **C:** D2 = número de especies muy abundantes = $1/\lambda$. No se dispone de datos para la muestra 16. 204

Figura 4.62: Diversidad beta. Representación de las dos primeras dimensiones del análisis NMDS para todo el periodo de muestreo, dividido en tres fases atendiendo a cambios operacionales ocurridos durante el mismo. Izquierda: periodo sin recirculación desde la cámara aeróbica a la anóxica; Centro: periodo de estabilización de la comunidad; Derecha: pérdida de diversidad debido a las lluvias registradas durante los muestreos de marzo y junio (sin datos) del segundo año, como consecuencia del aumento del caudal de purga de fangos a partir de octubre del segundo año y/o como proceso de estabilización de la comunidad en el sistema. 206

Figura 4.63: Análisis de redundancia (RDA). Los círculos y triángulos corresponden a cada muestra en el primer o segundo año de muestreo, respectivamente. Los puntos negros representan el centroide del primer y segundo año de muestreo. El color es indicativo del mes de muestreo y las líneas muestran los factores fisicoquímicos restringidos en la ordenación. Se incluyen los parámetros que más se correlacionan con los OTU..... 207

Figura 4.64: Correlación de rango de Spearman entre protistas y micrometazoos respecto a la comunidad bacteriana. Aparecen coloreados cuatro (4) módulos donde determinados ASV de bacterias sólo se correlacionaron de manera significativa con un protista o micrometazoo. 209

Figura 4.65: Proporción de bacterias amonio y nitritos oxidantes en el reactor A/O respecto del total de bacterias viables. AOB anox: bacterias amonio oxidantes en la cámara anóxica; NOB anox: bacterias nitrito oxidantes en la cámara anóxica; AOB aer: bacterias amonio oxidantes en la cámara aeróbica; NOB aer: bacterias nitrito oxidantes en la cámara aeróbica. 210

Figura 4.66: Microfotografías correspondientes a células marcadas presentes en los flóculos. Observación del grupo funcional amonio oxidantes en rojo (izquierda) y del grupo funcional nitrito oxidantes en verde (derecha). Imagen perteneciente a un flóculo de la cámara aeróbica de la muestra AVM12. 211

Figura 4.67: Muestra AER1; A) *Comammox* (Ca. *Nitrospira nitrosa*, Ca. *Nitrospira nitrificans*) sonda Ntspa0476, flecha blanca 1000X; B) Eubacteria mezcla de sonda EUB 338I, 338II y 338III, *Comammox* (Ca. *Nitrospira nitrosa*, Ca. *Nitrospira nitrificans*) flecha blanca 1000X; C) Eubacteria mezcla de sonda EUB 338I, 338II y 338III y *Comammox* (Ca. *Nitrospira nitrosa*, Ca. *Nitrospira nitrificans*) Sonda Ntspa0476 (naranja), flecha blanca 1000X. 212

Figura 4.68: Muestra AER1: A) Género *Nitrospira* sonda Ntspa662, flecha blanca 600X; Eubacteria mezcla de sonda EUB 338I, 338II y 338III, género *Nitrospira* flecha blanca 600X; C) Eubacteria mezcla de sonda EUB 338I, 338II y 338III y género *Nitrospira* sonda Ntspa662 (naranja) flecha blanca 600X. 212

Figura 4.69: Concentración promedio, en copias/ μ L, de cada una de las dianas analizadas correspondientes a bacterias/arqueas nitrificantes mediante PCR digital. El asterisco (*) hace referencia a la concentración obtenida para el gen *NxrB* de *Nitrospira* de una muestra adicional empleando las mismas condiciones analíticas. 213

Figura 4.70: Proporción de las familias relacionadas con la nitrificación detectadas presentes en la EDAR Arroyo Valenoso cuantificadas mediante secuenciación masiva presentes en la cámara aeróbica. 214

Figura 4.71: Proporción de los géneros relacionados con la nitrificación detectadas presentes en la EDAR Arroyo Valenoso cuantificadas mediante secuenciación masiva presentes en la cámara aeróbica. 215

Figura 4.72: Proporción de especies del género *Nitrospira* presentes en la cámara aeróbica de la EDAR Arroyo Valenoso cuantificadas mediante secuenciación masiva.... 215

Figura 4.73: Respuesta a la tinción Gram de un flóculo procedente de la cámara anóxica, muestra AVM2. 216

Índice de Figuras

Figura 4.74: Fotografía del gel de electroforesis realizado tras la purificación de los amplicones de las cepas de la colección 95,97,98,99,100,101,102,104,105,106,107,108 y 110.	217
Figura 4.75: Cepas 6, 7 (izquierda) y cepas 6 y 10 (derecha) incubadas junto con las cepas biosensoras CV026 y VIR07.	219
5. DISCUSIÓN.....	225
Figura 5.1: Diferencias entre la nitrificación microbiana tradicional, bacterias AOB con fondo amarillo y bacterias NOB con fondo azul, y la nitrificación bacteriana comammox, con fondo verde (Luo2022).	243

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso esencial en la Tierra puesto que es la base de la actividad abiótica y un componente esencial para la vida. Los organismos vivos están compuestos por más de un 80% de agua, siendo esta necesaria para el desarrollo de los procesos metabólicos vitales. El agua podría ser considerada como un recurso renovable, siempre y cuando su uso fuera debidamente controlado tanto en cuanto a su utilización en ambientes urbanos e industriales, como respecto a los tratamientos y condiciones de liberación a los ambientes naturales. Este recurso se extrae de medios naturales (medios marinos, continentales y aguas subterráneas) y se ha utilizado históricamente para el beneficio del ser humano, si bien, a partir del gran desarrollo de los núcleos de población y de las actividades industriales, agrícolas y ganaderas, se ha producido un deterioro progresivo de su calidad ecológica y sanitaria. Ha sido una práctica común la ubicación de industrias y asentamientos humanos en las zonas fluviales, lo que ha facilitado su utilización, pero al mismo tiempo ha supuesto el vertido de los residuos generados en la zona. Estos vertidos han provocado un incremento de la cantidad de diversos contaminantes en los medios receptores, entre otros, materia orgánica y nutrientes inorgánicos (principalmente N y P). La materia orgánica se encuentra en concentraciones muy elevadas en el agua residual urbana y en muchos residuos agrícolas, ganaderos e industriales, su exceso en el agua residual provoca en el medio acuático una contaminación trófica que altera, fundamentalmente, la disponibilidad de oxígeno y produce un impacto sobre la composición de las comunidades bióticas y la biodiversidad.

Aunque el agua se considera un recurso renovable, la disponibilidad de agua limpia, libre de contaminantes, está disminuyendo de manera constante por la actividad humana. Por otra parte, la población mundial aumenta progresivamente y, por lo tanto, aumenta la demanda de agua para el consumo, de forma que en muchas partes del mundo la demanda de agua ya excede el abastecimiento. Dada su importancia para todos los seres vivos y teniendo en cuenta el aumento de las necesidades de este recurso, se determinó la necesidad y la obligación de una legislación destinada a su protección. Según el Real Decreto 509/1996, de 15 de marzo (BOE 29 de marzo), de desarrollo del Real Decreto-ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas (MOPA, 1996), se establece un límite máximo de vertido de materia orgánica como DBO_5 de 25 mgO_2/L . La materia orgánica es degradada por la actividad microbiana durante el proceso de depuración,

especialmente en el tratamiento secundario, eliminándose aproximadamente un 85% de la misma.

1.1. Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales

Las **estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR)** son una de las aplicaciones biotecnológicas más empleadas a nivel mundial (Seviour & Nielsen, 2010; Y. Xia et al., 2018; Y. Yang et al., 2020). Se definen como un conjunto de instalaciones cuyo objetivo es reducir la contaminación de las aguas residuales hasta límites aceptables para el cauce receptor. Para lograrlo, el agua influente se somete a diversos tratamientos físicos, químicos y biológicos (CdYII, 2022; Doménech, 2003; Hernández, 1992; Rodríguez et al., 2008) además, después del tratamiento, el efluente deberá cumplir con los requisitos legales de vertidos de aguas depuradas recogido en el RD 509/1996 (MOPA, 1996).

Un agua residual puede definirse como un residuo líquido recogido mediante una red de alcantarillado para su envío a una planta depuradora (Mujeriego, 1990). El tipo y la cantidad de agua residual influente a una estación depuradora reflejan la naturaleza del área a la que sirve, el uso que se le ha dado y las condiciones del medio de conducción y/o transporte (Knobelsdorf, 2005).

Los principales contaminantes presentes en el agua residual son compuestos orgánicos biodegradables y/o volátiles, materia particulada (sólidos), compuestos recalcitrantes y xenobióticos, nutrientes (N y P), metales pesados, y microorganismos patógenos (véase Tabla 1.1) (Dewisme, 1997; Matia et al., 1999). Los avances en el proceso de eliminación de estos compuestos han sido posibles gracias a la investigación transversal, tanto en el diseño de la planta como en la naturaleza y función de las comunidades biológicas del sistema (Bitton, 1994) ya que, en sus inicios, el objetivo era únicamente la eliminación de la materia orgánica soluble y particulada (sólidos en suspensión) (Arden & Lockett, 1914).

Contaminantes del agua	Impactos más significativos
Materia en suspensión	Aumento de la turbidez del agua (alteración de la fotosíntesis y reducción de la producción de oxígeno)
	Sedimentación (obstrucción y depósito en el lecho de los ríos)
Compuestos inorgánicos	Ecotoxicidad de algunos compuestos, como las sales de metales pesados.
	Reacciones con sustancias disueltas en el agua, formación de compuestos tóxicos
Conductividad	Concentraciones elevadas de sales que alteran la capacidad de supervivencia de diversas especies vegetales y animales
Nutrientes	Crecimiento anormal de algas y bacterias (aumento de la turbidez del agua)
	Aceleración de la eutrofización del agua
Materia orgánica	Su descomposición puede provocar la disminución de la concentración del oxígeno disuelto en el agua hasta alcanzar condiciones sépticas
	Eutrofización del agua
	Emisión de metano en el caso de aparición de procesos anaerobios
Compuestos orgánicos tóxicos	Toxicidad para la vida acuática
	Disminución de la concentración de oxígeno debido a los procesos de biodegradación
	Producción, en el caso de líquidos no miscibles, de una película superficial que impide la oxigenación del agua
Organismos patógenos	Inutilización del agua para consumo humano
Bacterias, virus y parásitos	Contaminación del medio acuático con organismos que podrían llegar al hombre a través de la cadena trófica
	Enfermedades de transmisión hídrica asociadas a la contaminación microbiológica del agua
Contaminación térmica por descarga de aguas de refrigeración	Modificación de la solubilidad del oxígeno en el agua Aceleración del metabolismo de la biota acuática (eutrofización). Alteración de los ecosistemas acuáticos

Tabla 1.1: Contaminantes presentes en un agua residual y sus posibles efectos sobre el medio receptor.
Fuente: (Knobelsdorf, 2005).

Como ya se ha mencionado, con el desarrollo urbanístico y la disminución de agua disponible por el deterioro ambiental, se ha producido una mayor escasez de agua para consumo y, a la vez, un aumento del agua residual generada. El posible impacto sobre el medio ambiente de este residuo ha propiciado una necesidad de mejora de los sistemas de depuración para lograr alcanzar unos límites de calidad del agua depurada que posibiliten su reutilización. Los **sistemas MBR (Membrane Bioreactors, Biorreactores de Membrana)** combinan membranas de ultrafiltración (Figura 1.1) con el proceso de fangos activos (EPA, 1998) en el tratamiento secundario. Este tipo de EDAR presenta una serie de ventajas respecto a los sistemas tradicionales de depuración, entre las que se destaca: el menor requerimiento espacial para su implantación,

la elevada calidad de efluente obtenido, la independencia del proceso de decantación del fango o la posibilidad de desarrollo de microorganismos de crecimiento lento como son los implicados en la **eliminación del nitrógeno**. El principal inconveniente es el **ensuciamiento de las membranas**, aspecto que se contemplará en un apartado posterior.

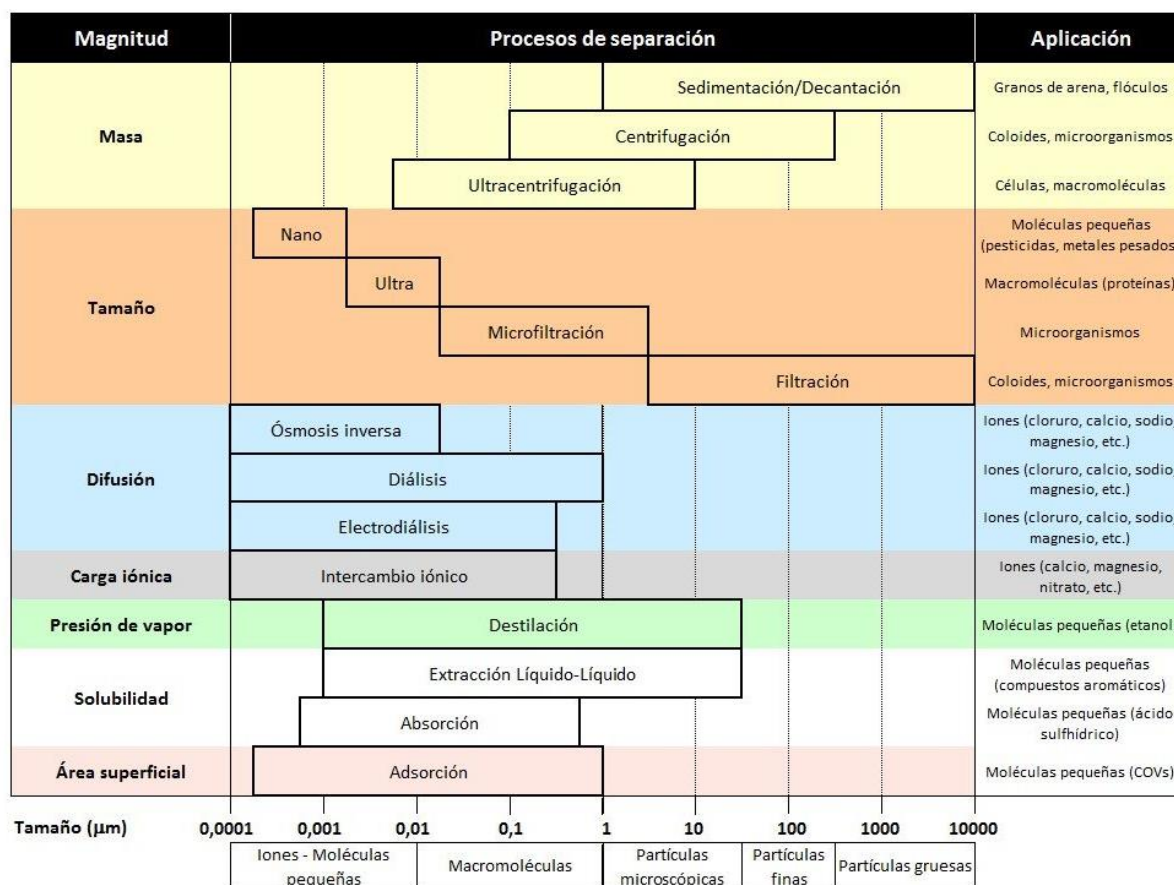


Figura 1.1: Técnicas de separación para retener partículas en suspensión. Fuente: <https://condorchem.com/es/blog/metodos-de-separacion-de-aguas-residuales/>.

1.2. EDAR Arroyo Valenoso

La Estación Depuradora de Aguas Residuales de Arroyo Valenoso es, por su tecnología innovadora, una de las instalaciones más avanzadas de la Comunidad de Madrid, además de ser una de las más destacables de España en lo que concierne al respeto al medioambiente (Sedano et al., 2014)

La instalación está ubicada en la cuenca del río Guadarrama, en el término municipal de Boadilla del Monte (Comunidad de Madrid, España), prestando servicio a esta localidad. Está

diseñada para tratar 40.000 habitantes equivalentes (he) y tiene una capacidad de tratamiento de hasta 12.000 m³ diarios de agua residual. Para la realización del diseño de la instalación, se partió de las calidades del agua bruta y tratada especificadas por Sedano y colaboradores (Sedano et al., 2014) y recogidas en las Tablas 8.1 y 8.2 del Anexo. A la salida del tratamiento secundario, la planta está preparada para cumplir con los parámetros de calidad conforme a la legislación vigente (Tabla 8.3 del Anexo) y establecidos en el RD 509/1996 (MOPA, 1996) y mostrados en las Tablas 8.4 y 8.5 del Anexo.

Las aguas residuales, una vez llegan a la instalación (Figura 1.2), son sometidas a un proceso de desbaste y desarenado con el fin separar los sólidos de gran tamaño que pudiesen alterar los procesos de depuración posteriores. Para ello, el agua pasa a través de un sistema de rejillas, de tamaño progresivamente menor, donde los residuos sólidos quedan retenidos. Después, el agua pretratada se dirige al tratamiento de desarenado y desengrasado, en cuya zona inferior se acumulan por gravedad las arenas sedimentadas como consecuencia de la baja velocidad de circulación del agua mientras que las grasas se recogen de la superficie mediante rasquetas.

Si, por circunstancias excepcionales, el agua recibida en la instalación superase el volumen de capacidad del tratamiento biológico, la planta cuenta con un tratamiento fisicoquímico de emergencia en el que se añaden reactivos capaces de alterar la naturaleza física de las partículas que componen los sólidos disueltos provocando su coagulación en partículas más grandes, separables mediante decantación.

El tratamiento secundario consiste en un tratamiento biológico de oxidación prolongada. Cuenta con dos líneas de agua y cada una de ellas consta de un reactor A/O (anóxico/óxico) con dos cámaras anóxicas, de 615 m³, tres cámaras aeróbicas de 957 m³ y un tanque membranas o reactor MBR.

El agua pretratada ingresa en la cámara anóxica del reactor biológico, donde se mezcla con el fango procedente de las purgas del tanque de membranas, en esta fase tiene lugar la desnitrificación. En la cámara aeróbica, que incluye aireadores para el aporte externo de oxígeno, se produce principalmente la oxidación de la materia orgánica, así como la nitrificación. La eliminación biológica del nitrógeno se complementa con la eliminación del fósforo por vía química mediante la adición de cloruro férrico a la entrada y a la salida del reactor biológico.

El biorreactor de membranas, de tipo externo, se sitúa a continuación y en él tiene lugar la separación física del agua y la biomasa floculante, gracias al filtrado a través de un sistema de membranas de ultrafiltración.

Este tanque de membranas consta de cuatro líneas con un volumen unitario de 127 m³. Cada línea tiene cuatro casetes que a su vez contienen, cada uno, cuarenta y cuatro módulos. Estas membranas de ultrafiltración están inmersas en un tanque en contacto directo con el licor mezcla y presentan un poro nominal de 0,04 µm. Mediante una bomba de permeado, se aplica el vacío al colector que está conectado a las membranas; el vacío dirige al agua tratada a través de la fibra hueca de las membranas de ultrafiltración, obteniéndose como resultado una eficaz retención de los elementos suspendidos y de los compuestos solubles. El agua permeada es extraída del sistema y almacenada en un depósito para su posterior vertido al cauce o para su posible reutilización.

Este ciclo se alterna con uno corto contra-lavado, en el que se invierte el sentido del flujo, con lo que se fuerza el paso del agua filtrada desde el interior al exterior para la limpieza de las membranas. El fango y los compuestos de tamaño superior al poro de la membrana quedan retenidos y pasan al proceso de tratamiento de fangos, o retornan al tratamiento biológico.

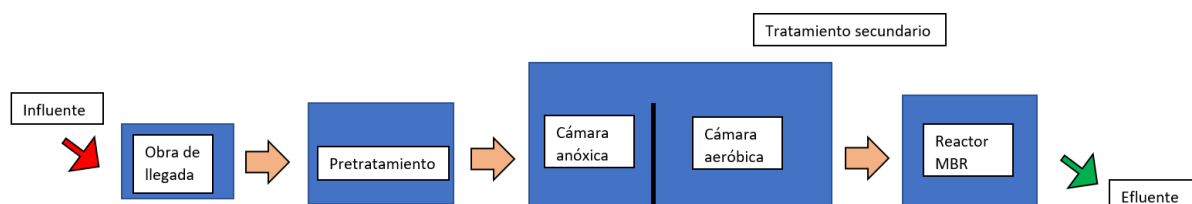


Figura 1.2: Representación esquemática de la línea de agua 1 de la EDAR Arroyo Valenoso.

Por tanto, el tratamiento secundario de la EDAR de Arroyo Valenoso consiste en un tratamiento biológico de oxidación prolongada, lo que supone una menor producción de lodo y un coste de explotación considerablemente menor. Dispone, además, de la tecnología de reactores biológicos de membrana, cuya aplicación permite la separación del fango y el agua a través del filtrado, por lo que se puede prescindir de los tradicionales decantadores secundarios, lo que deriva en una instalación de menor tamaño que el de las depuradoras convencionales. Asimismo, la instalación se encuentra en el interior de un edificio por lo que se reduce su impacto visual y los reactores están cubiertos para evitar los problemas de ruidos y olores. Por

último, el excedente de agua se vierte al cauce del Arroyo Valenoso, con el objetivo de recuperar su caudal ecológico.

1.3. Tratamiento biológico: el microbioma de las EDAR

Las aguas residuales contienen una gran variedad de microorganismos: virus, bacterias, hongos, protistas y algunos micrometazoos como rotíferos y nemátodos. Se estimó que había alrededor de 5 millones de especies microbianas en este tipo de ambiente, de los cuales menos del 5% fueron catalogadas (Cloete, 1997). Estudios posteriores determinaron que en una EDAR hay aproximadamente 10^{18} microorganismos (Woodcock et al., 2006). Aproximaciones moleculares realizadas mediante secuenciación masiva han llegado a registrar hasta 5 millones de secuencias del ARNr 16s pertenecientes a bacterias y arqueas (Dueholm et al., 2021), una riqueza muy superior a las estimaciones previas.

La eliminación de la materia orgánica biodegradable, así como de otros contaminantes y nutrientes como nitrógeno y fósforo, la llevan a cabo los microorganismos presentes en los reactores biológicos. Como se ha mencionado en el apartado anterior, la EDAR estudiada en este trabajo, presenta tres compartimentos diferentes en su tratamiento biológico: el primero favorece el crecimiento de microorganismos desnitrificantes responsables de la conversión del nitrato procedente de la recirculación hasta nitrógeno gas (cámara anóxica); el segundo favorece el desarrollo de los microorganismos nitrificantes (oxidación del amonio a nitrito y éste a nitrato) y de todos aquellos que oxidan la materia orgánica y, finalmente, el reactor MBR, en el cual tiene lugar la ultrafiltración del agua previamente a su vertido al cauce receptor. El tiempo de retención celular es elevado en este último compartimento, lo que permite el desarrollo de una microbiota característica que potencia la oxidación de la materia orgánica, obteniendo y generando un menor residuo en forma de lodo.

El proceso depende, en todo caso, de una biomasa activa (**fango activo**) que se mantiene en suspensión y mezclada con el agua residual influente (Knobelsdorf, 2005; Lee, 1996; Muyima et al., 1997; Winkler et al., 2013). El fango está formado por la adhesión de células y contaminantes a una matriz exopolimérica compleja (Cyzdik-Kwiatkowska & Zielińska, 2016). El **flóculo** es la unidad ecológica y estructural del fango activo y constituye el núcleo alrededor del cual se desarrolla el proceso de depuración biológica, esta biomasa se puede mantener en suspensión o adherida a un material de soporte (Droste & Gehr, 2018; Lee, 1996), en esta

EDAR el flóculo se encuentra en suspensión. El componente biológico en el fango está constituido por una amplia variedad de microorganismos que participan activamente en el tratamiento biológico (Fernández-Galiano et al., 1996; Liébana et al., 2016; Muyima et al., 1997; Petropoulos & Gilbride, 2005) y que descomponen los compuestos orgánicos en las aguas residuales (Aonofriesei & Petrosanu, 2007; Fernández-Galiano et al., 1996). El componente no biológico lo constituyen partículas orgánicas o inorgánicas presentes en el agua residual, así como los polímeros extracelulares (mayoritariamente carbohidratos) generados por los propios microorganismos (Jenkins et al., 2003; Lee, 1996; Winkler et al., 2013).

Por tanto, el tratamiento mediante fangos activos elimina de las aguas residuales las sustancias orgánicas biodegradables, así como los sólidos suspendidos no sedimentables y otros componentes que son absorbidos, atrapados o metabolizados en el flóculo (Fernández-Galiano et al., 1996; Viessman et al., 1998). La naturaleza del flóculo está determinada por dos niveles estructurales denominados micro y macroestructura (Jenkins et al., 2003).

1.3.1. Protistas y micrometazoos del fango activo

Las poblaciones de protistas juegan un papel funcional clave en las EDAR (Curds, 1968; Curds & Cockburn, 1970a; Curds, 1982; Morishita, 1970), son componentes relevantes de la cadena trófica microbiana en sistemas de fangos activos (Ratsak et al., 1996). Como bacterívoros regulan la biomasa bacteriana al depredar sobre las bacterias dispersas del licor de mezcla o floculantes (Madoni, 1988; Ratsak & Verkuijlen, 2006), además participan en el desarrollo y la estructura de los flóculos, así como a la floculación, lo cual se ha relacionado con la mayor o menor eficiencia en el proceso de fangos activos (Arregui et al., 2008; Arregui et al., 2007; Curds, 1968; Ratsak & Verkuijlen, 2006; Salvadó et al., 1995).

La composición y la distribución de las poblaciones de los protistas están directamente relacionadas con el tipo de proceso de tratamiento de aguas residuales aplicado, las condiciones de operación y la calidad y cantidad de las aguas residuales involucradas (Lee et al., 2004; Liu et al., 2008).

Algunos especialistas proponen que los protistas podrían estar distribuidos de manera ubicua en nuestro planeta, si bien este ha sido un tema controvertido (Fenchel & Finlay, 2004; Foissner, 2006). Este argumento es muy similar a los debates sobre la distribución de bacterias.

La propuesta de que “todo está en todas partes” promulgada por M.W. Beijerinck a principios del Siglo XX (Foissner, 2006; O'Malley, 2008) es defendida con firmeza por muchos microbiólogos, pero otros lo refutan enérgicamente (Anderson, 1992; Hausmann et al., 2004; Weisse, 2004; Weisse et al., 2001). Las técnicas de secuenciación de alto rendimiento están comenzando a abordar este tema respecto a las bacterias (Mou et al., 2008; Sogin et al., 2006), si bien estos enfoques y métodos de la genética de poblaciones bacterianas se están también adaptando actualmente para la investigación sobre la ecología de protistas (Garner et al., 2021; Zahedi et al., 2019), por lo que se dispondrá de una información más completa sobre la biogeografía de estos microorganismos (Caron et al., 2009).

Muchos autores han señalado que los protistas son buenos indicadores del rendimiento y la eficiencia del proceso de depuración (Al-Shahwani & Horan, 1991), habiéndose ya realizado numerosos estudios al respecto en EDAR convencionales (Curds & Cockburn, 1970b; Dubber & Gray, 2011; Esteban et al., 1991; Hu et al., 2013; Lee et al., 2004; Liu et al., 2008; Luna-Pabello et al., 1990; Nicolau et al., 2001; Salvadó, 1994; Salvadó & Gracia, 1993), incluyendo trabajos realizados sobre varias depuradoras (Al-Shahwani & Horan, 1991; Dubber & Gray, 2011; Hu et al., 2013; Madoni et al., 1993; Martín-Cereceda et al., 1996; Salvadó et al., 1995). Según estos estudios, la mayor diversidad y abundancia, en general, corresponde a los protistas ciliados (Al-Shahwani & Horan, 1991; Curds & Cockburn, 1970a; Dubber & Gray, 2011; Esteban et al., 1991; Madoni, 1994, 2011; Madoni & Ghetti, 1981; Signorile et al., 2010; Tyagi et al., 2008; Zhou et al., 2006). Madoni (Madoni, 2004) propone tres grupos funcionales de ciliados: nadadores, sésiles y reptantes. Además, se han propuesto índices numéricos, basados en características macroscópicas y microscópicas de los fangos, incluyendo el número de especies de protistas, como el Índice de Fango (Isac et al., 2001; Rodríguez et al., 2008) o basados únicamente en la presencia y densidad de ciertos grupos de protistas como el índice biótico de Madoni (Madoni, 1994).

Se han realizado diversos estudios sobre la comunidad de protistas de EDAR de tipo MBR en zonas urbanas (Arévalo et al., 2009; Dubber & Gray, 2011; Liu et al., 2008; Pérez-Uz et al., 2009; Pérez-Uz et al., 2010; Pérez-Uz et al., 2008; Serrano et al., 2008). Según estos autores, las comunidades de protistas en este tipo de plantas son distintas a las de EDAR convencionales presentando, por lo general, densidades más bajas y sensibles diferencias en su composición. En estos sistemas, los flagelados bodónidos, representados fundamentalmente por la especie *Bodo saltans*, alcanzan las densidades más elevadas; las amebas son más comunes

que en las plantas convencionales y podrían ser consideradas, en general, como componentes de la comunidad estable (están implicados en la depredación bacteriana tanto en el flóculo como en el licor mezcla), mientras que los ciliados presentan densidades más bajas que en otras plantas, pero una mayor diversidad.

Por último, Pérez-Uz y colaboradores (Pérez-Uz et al., 2010) proponen que los flagelados y las amebas pequeñas están relacionados con altos rendimientos de eliminación de N, y que ciliados como *Uronema nigricans*, *Vorticella aquadulcis*, *Epistylis balatonica* y *Gastromyxa membranaceus* podrían considerarse como potenciales indicadores de una deficiente eliminación de nitrógeno.

1.3.2. Comunidad procariota del fango activo

Las bacterias constituyen la mayor parte de la biomasa del proceso ($3-16 \times 10^6$ UFC/L) siendo, por tanto, el grupo dominante dentro de la comunidad biótica de los fangos activos. Su pequeño tamaño y su relación superficie/volumen favorecen el intercambio de nutrientes y catabolitos con el medio que los rodea. Las bacterias predominantes son saprofitas, responsables de la degradación y mineralización de los compuestos orgánicos, y pertenecen en su mayoría a géneros aerobios facultativos Gram-negativos; también las hay quimilitótrofas, capaces de oxidar el amoníaco y los nitritos en sistemas compartimentados (Fernández-Galiano et al., 1996).

La presencia de ciertas bacterias también puede tener efectos desfavorables sobre los fangos activos. El desarrollo incontrolado de muchas bacterias de tipo filamentoso impide una sedimentación eficaz de los fangos y produce el fenómeno de *bulking* o fangos voluminosos o esponjosos (Knobelsdorf, 2005).

1.3.2.1. Procariotas implicados en la eliminación biológica del nitrógeno

La eliminación biológica del nitrógeno en sistemas de depuración de aguas residuales se produce por la actividad metabólica de i) bacterias nitrificantes, que convierten secuencialmente el amonio en nitritos y nitratos en condiciones aeróbicas y ii) bacterias desnitrificantes que metabolizan los nitratos a nitrógeno gaseoso, en condiciones anóxicas.

La **nitrificación** se ha atribuido tradicionalmente a dos grupos diferentes de bacterias (Figura 1.3): bacterias oxidantes de amonio (*AOB*, *ammonia oxidizing bacteria*) que metabolizan el sustrato amonio (NH_4^+) hasta nitrito (NO_2^-) según la ecuación 1; y bacterias oxidantes de nitritos (*NOB*, *nitrite oxidizing bacteria*) responsables de la oxidación del nitrito hasta nitrato (NO_3^-) según la ecuación 2.

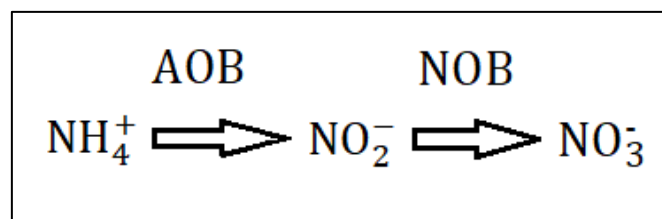
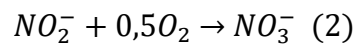
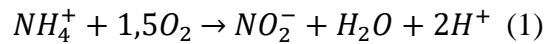


Figura 1.3: Representación esquemática de las etapas de oxidación del amonio y del nitrito realizada por las bacterias *AOB* y *NOB*.

La conversión de amonio en nitrato se ha concebido como un proceso de dos pasos llevado a cabo por estos dos grupos altamente especializados de bacterias quimiolitótrofas y autótrofas aeróbicas obligadas. Sin embargo, recientemente se ha descrito un número restringido de especies, todas ellas pertenecientes hasta ahora al género *Nitrospira*, que pueden llevar a cabo la oxidación completa del amonio a nitrato, las bacterias **comammox** (*complete ammonia oxidation*) (Daims et al., 2015; van Kessel et al., 2015).

Con el rápido desarrollo y aplicación en estos sistemas de técnicas de biología molecular, se pueden estudiar cada vez más detalladamente la distribución, la filogenia y las propiedades metabólicas de los microorganismos que participan en el ciclo del nitrógeno, que con anterioridad habían pasado desapercibidos. Las AOA (*Ammonia Oxidizing Archaea*, Arqueas Oxidantes de Amonio) o las bacterias *comammox* son un ejemplo de los nuevos grupos de microorganismos nitrificantes autótrofos descubiertos mediante estudios genómicos que no se habían detectado mediante metodologías tradicionales (Xu et al., 2021).

Todas las bacterias descritas como *comammox* pertenecen, por el momento, al sublinaje II del género *Nitrospira*, en el cual se incluyen también otras bacterias nitrito-oxidantes, que no

presentan la maquinaria enzimática necesaria para la oxidación de los compuestos nitrogenados reducidos. Se considera que las bacterias *comammox* adquirieron los genes que codifican para la enzima amonio monooxigenasa (AMO) mediante transferencia horizontal de genes (van Kessel et al., 2015), lo que ha permitido su empleo como marcador molecular y facilitado su detección e identificación. Las especies *comammox* presentan, en un mismo grupo, las enzimas claves para oxidar el amonio, una enzima AMO y una hidroxilamina deshidrogenasa (HAO). La enzima AMO consiste en dos o más subunidades asociadas a la membrana celular, con un centro activo con tres átomos de cobre (Nguyen et al., 1998).

Según las secuencias del gen *amoA*, las bacterias *comammox* se dividen en los clados A y B (Daims et al., 2015; Pjevac et al., 2017) estando este último menos distribuido en el ambiente y asociado principalmente a la microbiota desarrollada en los bosques, mientras que el clado A puede subdividirse en tres grupos: clado A.1, muy ampliamente distribuido y dominante en ambientes acuáticos; clado A.2, dominante en suelos; y clado A.3, que debido a la homogeneidad en sus secuencias se cree que no es muy abundante (Zhu et al., 2022). Las enzimas de ambos clados difieren entre ellas en el transporte de sustrato, la transferencia de energía y su adaptabilidad al entorno cambiante (Palomo et al., 2018). Sus genes codificantes han sido claves para el diseño de cebadores útiles en la técnica de la PCR convencional y cuantitativa para permitir su detección y cuantificación, respecto a lo cual ya se han publicado recientemente varios estudios referentes al tema (Bartelme et al., 2017; Camejo et al., 2017; Daims et al., 2015; Fowler et al., 2018; Jiang et al., 2020; Pinto et al., 2016; Pjevac et al., 2017; van Kessel et al., 2015; F. Xia et al., 2018). En este trabajo se ha utilizado, además, la PCR digital, que supone una nueva generación de esta técnica y que confiere una mayor sensibilidad en la detección de la diana objeto de estudio permitiendo, además, su cuantificación.

Desde la identificación de las AOA, numerosos estudios se han centrado en su distribución ambiental, su fisiología y su genética para dilucidar su importancia ecológica y los factores potenciales para la diferenciación de nichos entre AOA y bacterias nitrificantes [artículos de revisión de algunos autores como (Hatzenpichler, 2012) y (Prosser & Nicol, 2012)].

Las AOA prevalecen en diversos entornos marinos, de aguas termales, corales y suelos (Hatzenpichler, 2012). Poseen genes únicos *ADNr 16s* y *amoA* que las distinguen de AOB (Könneke et al., 2005). Las AOA son de menor tamaño y tienen una mayor afinidad por el amonio y el oxígeno y una menor tasa de utilización de amonio que las AOB (Kits et al., 2017;

Martens-Habbena et al., 2009), pudiendo crecer en ambientes ácidos/alcalinos, calientes/fríos y eutróficos/oligotróficos (Hatzenpichler, 2012).

1.3.2.2. *Bacterias relacionadas con el bioensuciamiento de las membranas del MBR*

En las membranas de ultrafiltración del reactor MBR se consideran tres tipos generales de ensuciamiento: inorgánico, orgánico y bioensuciamiento (Hong et al., 2018; Iorhemen et al., 2016); siendo este último el que se contemplará en el presente trabajo. Este **bioensuciamiento** es debido a la interacción de los microorganismos con la superficie de la membrana, donde se adsorben y multiplican gracias a la gran cantidad de nutrientes presentes en el licor mezcla y se secretan diversas sustancias poliméricas que forman una matriz que mantiene unidos diversos microorganismos, llegándose a formar una **biopelícula** compleja (*biofilm*) que puede obstruir los poros de las membranas y comprometer la eficiencia del proceso de filtración (Chang et al., 2002; Hong et al., 2018; Iorhemen et al., 2016; Takimoto et al., 2018).

El proceso de bioensuciamiento se desarrolla en cuatro etapas (Figura 1.4): a) acondicionamiento de la superficie de la membrana por depósito de pequeñas partículas; b) obstrucción de los poros con moléculas de mayor tamaño; c) formación de la biopelícula y d) bioensuciamiento irreversible (Hong et al., 2018).

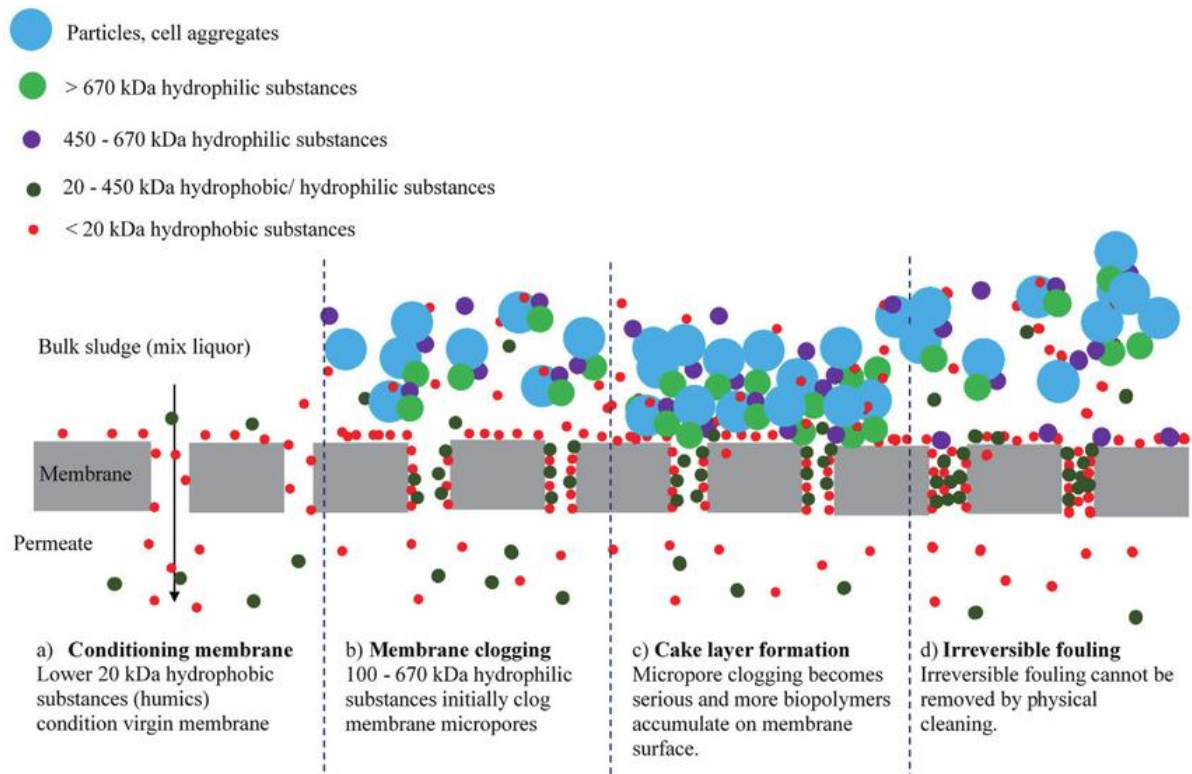


Figura 1.4: Representación esquemática del proceso de bioensuciamiento en un sistema MBR (kDa, kiloDalton). Fuente: (Hong et al., 2018).

Las biopelículas están formadas, normalmente, por una capa de espesor variable que contiene microorganismos viables y/o no viables junto con sus productos extracelulares tales como glucoproteínas, lípidos, ácidos nucleicos, etc. Además del contra-lavado empleado de forma habitual, en esta EDAR, la limpieza de las membranas suele ser de tipo químico, empleándose sosa e hipoclorito sódico de manera combinada. En otros casos se utilizan detergentes enzimáticos (proteasas o lipasas) que actúan de manera específica; el protocolo de limpieza se va adaptando en función de la capacidad de permeado de la membrana. De este modo, se consiguen minimizar las necesidades de mantenimiento y alargar la vida media de las membranas.

Las biopelículas bacterianas pueden formarse tanto en superficies abióticas como en superficies bióticas y pasan por distintas etapas que pueden clasificarse en términos generales en etapa de adhesión reversible y etapa de cohesión irreversible (Figura 1.5) (Flemming et al., 2016; Kumar et al., 2017).

Los modelos *in vitro* de formación de biopelículas no representan necesariamente el resultado en los modelos *in vivo* debido a diferencias en el entorno relacionadas con la disponibilidad de nutrientes, el estrés, etcétera (Kumar et al., 2017). El ciclo de desarrollo de una biopelícula tiene cuatro fases (Figura 1.5): la unión inicial de bacterias a una superficie “acondicionada”, la formación de micro colonias, el crecimiento de los microorganismos y la generación de la matriz extracelular, la formación de una biopelícula madura y, finalmente, la dispersión de las bacterias para encontrar nuevos nichos (Lu et al., 2019). La biopelícula comienza a formarse con la unión inicial de bacterias a la superficie que luego se convierte en una unión irreversible. El ADN extracelular, las proteasas, las proteínas de la superficie celular o las proteínas asociadas a la biopelícula están involucradas en la colonización inicial de la biopelícula.

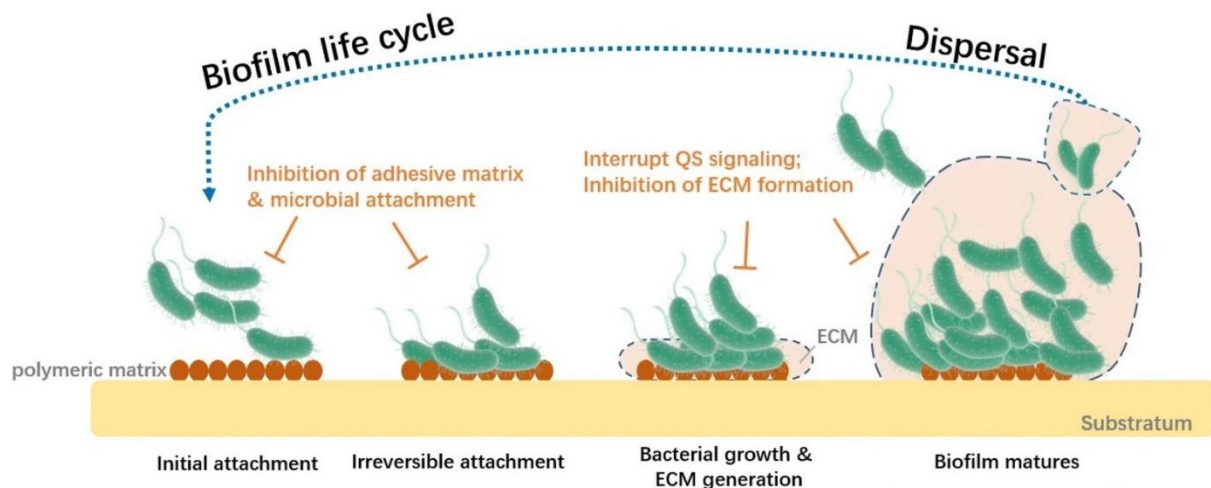


Figura 1.5: Formación de la biopelícula: se muestran las cuatro etapas principales de la formación de una biopelícula.

Los componentes de la matriz varían según las especies bacterianas involucradas en la formación de biopelículas (Kumar et al., 2017). Las biopelículas tienen propiedades intrínsecas que involucran principalmente la composición de la comunidad y las interacciones sociales en biopelículas de múltiples especies (Madsen et al., 2018). Tales propiedades influyen en el crecimiento de las bacterias constituyentes y su resistencia a ambientes desfavorables o el mantenimiento de un equilibrio ecológico (Burmølle et al., 2014; Douterelo et al., 2020; Madsen et al., 2018; Røder et al., 2020; Tan et al., 2017), además, contribuyen a la resistencia a depredadores, biocidas y otros factores que pueden causar efectos negativos sobre las bacterias, por ejemplo, la respuesta inmune del huésped o los antibióticos en bacterias patógenas (Costerton, 1999).

Sistemas de comunicación celular: *Quorum Sensing*

El *Quorum Sensing* (QS) es uno de los procesos de comunicación intrapoblacional más relevantes descubierto en los últimos años en el ámbito de la Microbiología. Este término fue introducido por primera vez por Fuqua (Fuqua et al., 1994), si bien ya fue descrito en *Vibrio fischeri* en 1972 por Eberhard (Eberhard, 1972), quien lo consideró como una forma muy peculiar de comunicación célula a célula, en la que la expresión de determinados genes dependía de la densidad celular, de forma que cuando se alcanzaba una densidad elevada y se superaba una concentración crítica de unas moléculas de señal (MQS) o **autoinductores** (AI), se desencadenaba una respuesta (De Kievit & Iglewski, 2000; Greenberg, 1997); este proceso se ha descrito tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas.

El QS media, entre otros procesos, en la bioluminiscencia bacteriana (Miyashiro & Ruby, 2012; Reading & Sperandio, 2006; Urbanczyk et al., 2007), la formación de biopelículas (Flemming, 2020), la formación de úlceras en el aparato digestivo producida por *Helicobacter pylori* (Tomb et al., 1997) o la virulencia de diversas bacterias patógenas (Ali et al., 2017; Barnard et al., 2007; O'Loughlin et al., 2013; Personnic et al., 2021); también está implicado en procesos de transferencia génica y esporulación (Declerck et al., 2007; Parthasarathy et al., 2020; Sarwar & Garza, 2012).

Se han descrito muchas clases de autoinductores, destacando las **N-acil-homoserin lactonas** (AHL) en las bacterias Gram negativas, los oligopéptidos en las Gram positivas y algunos AI comunes como los de la clase AI-2 (Antunes et al., 2010; Fuqua et al., 2001; Fuqua et al., 1994).

El desarrollo de cepas biosensoras ha sido de gran utilidad para poner de manifiesto la capacidad de producción de, en particular, AHL en bacterias (Ravn et al., 2001). Todos los sistemas sensores se basan en la posibilidad de detección de una respuesta fenotípica claramente reconocible (Ravn et al., 2001), siendo ésta dependiente del reconocimiento de un rango de concentración concreto de AHL (McClellan et al., 1997).

En los sistemas de QS de tipo IR, las AHL son sintetizadas por un miembro de la familia de proteínas *LuxI*, que por su naturaleza hidrofóbica pueden difundir a través de la membrana hacia el exterior. Cuando la concentración de AHL alcanza un valor umbral, la proteína

receptora de AHL perteneciente a la familia de proteínas *LuxR* se une a las AHL regulando así la expresión de los genes responsables de la bioluminiscencia, la producción de pigmentos o antibióticos (Greenberg, 1997) o en el bioensuciamiento en biorreactores de membrana en EDAR (Deng et al., 2016; Liébana et al., 2016; Soler et al., 2018) entre otros procesos (Figura 1.6), siendo este último el que se contempla en el contexto de este trabajo.

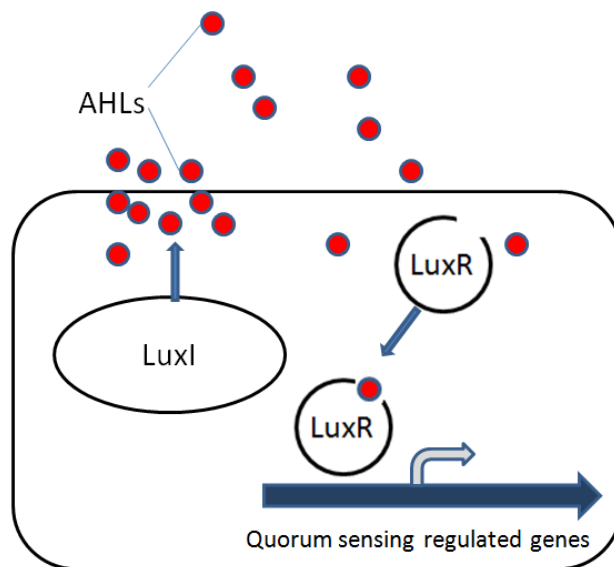


Figura 1.6: Esquema de inducción de la activación de genes mediante AHL. Adaptado de Yin y colaboradores (Yin et al., 2012).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo general en esta tesis doctoral fue el de analizar y comprender el proceso de depuración del agua residual, realizado en una EDAR con tecnología avanzada de la Comunidad de Madrid, a partir del estudio de la microbiota existente en el reactor biológico, su dinámica y su aplicación al proceso, además de determinar las poblaciones de procariotas implicadas en la nitrificación y contribuir a la comprensión del bioensuciamiento de las membranas de ultrafiltración.

Para lograrlo, se establecieron una serie de objetivos específicos que se detallan a continuación:

- 1) Determinar las propiedades fisicoquímicas del agua residual que recibe la EDAR Arroyo Valenoso, así como su evolución durante el tratamiento biológico y en la salida de la depuradora. Analizar las características del ambiente abiótico en los distintos compartimentos del tratamiento biológico.
- 2) Evaluar si la instalación se ajusta a las características de diseño, así como a la legislación vigente, en cuanto a términos de criterios de depuración se refiere.
- 3) Valorar la calidad biológica del flóculo, ambiente en el que se establece la comunidad microbiana responsable de la depuración del agua residual.
- 4) Describir la composición y la estructura de las poblaciones de protistas y micrometazoos, explicar su dinámica e identificar aquellos posibles bioindicadores de las variables ambientales y de control de proceso.
- 5) Estudiar la composición de la comunidad procariota, así como su dinámica, teniendo en cuenta tanto las poblaciones de bacterias como de arqueas.
- 6) Determinar las interrelaciones entre las poblaciones de microorganismos procariotas y eucariotas así como su interacción con los factores ambientales y de control durante el tratamiento secundario del agua residual.

- 7) Caracterizar las poblaciones de bacterias nitrificantes, su actividad y abundancia relativa en la comunidad bacteriana total. Determinar la contribución de las bacterias *comammox* en el proceso de nitrificación y su relación con el tipo de EDAR estudiada.

- 8) Aislar e identificar cepas bacterianas procedentes de la membrana de filtración, observar los mecanismos de comunicación por *Quorum Sensing* y examinar su capacidad de formación de biopelículas.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Toma de Muestras

Para la realización de este estudio en un contexto espaciotemporal, se tomaron muestras en la EDAR Arroyo Valenoso con una periodicidad mensual, durante 18 meses (desde marzo de 2017 a septiembre de 2018); en la Tabla 8.6 del Anexo se indican las fechas exactas de los diferentes muestreos realizados. Los puntos de muestreo se especifican a continuación, Punto 1: entrada de EDAR (influyente); Punto 2: cámara anóxica; Punto 3: cámara aeróbica; Punto 4: reactor MBR; y Punto 5: salida de EDAR (efluente). El volumen de cada muestra fue de 1 L para los puntos 1 y 5 y de 2 L para los puntos 2, 3 y 4 (Rodríguez et al., 2005). Para el estudio de la comunidad bacteriana, los muestreos se prolongaron hasta completar el periodo de 24 meses, finalizando, por tanto, en marzo de 2019. Los puntos de muestreo fueron los que se indican a continuación: Punto 1: cámara anóxica, Punto 2: cámara aeróbica y Punto 3: Reactor MBR. El volumen de muestra fue de 1 L en todos los casos.

Adicionalmente, y coincidiendo con el mantenimiento programado por la EDAR de uno de los casetes de membranas, se realizó un muestreo de las membranas (26 de septiembre de 2019) mediante raspado con hisopo de la superficie de éstas, se introdujeron en viales con suero salino (9 g NaCl/L) estéril y se conservaron a 4°C hasta su llegada al laboratorio.

3.2. Procesamiento de las muestras

Una vez en el laboratorio, las muestras se repartieron en alícuotas para realizar los diferentes ensayos planificados. Una alícuota de 250 mL para la determinación de la concentración de nutrientes (Nitrógeno de amonio ($N-NH_4^+$), Nitrógeno de nitritos ($N-NO_2^-$), Nitrógeno de nitratos ($N-NO_3^-$), NKjeldahl, Nitrógeno Total Oxidable (TON), Nitrógeno Total (NT) y Fósforo Total (PT)) y de la materia orgánica como DQO, una segunda de 500 mL (conservada a 4°C) para los ensayos dirigidos a la determinación de la materia orgánica como DBO_5 y una última de 250 mL para los ensayos relacionados con los sólidos presentes en el reactor; en todos los casos las alícuotas se conservaron a 4°C.

Una alícuota de 1 L se empleó para el estudio general del fango activo, 75 mL se mantuvieron a temperatura ambiente y en agitación para el estudio de la comunidad de protistas y

micrometazoos (Rodríguez et al., 2005). El resto del volumen se conservó a 4°C por si fueran necesarias nuevas alícuotas o la repetición de algún ensayo.

Por otro lado, se fijaron 10 mL en etanol absoluto para la realización de las preparaciones de *FISH* (conservación a 4°C) y 3 viales de 50 mL cada uno, de los tres puntos de muestreo del reactor biológico, para los análisis de secuenciación masiva y conservados a -80°C.

Las muestras se designaron conforme al siguiente criterio: AVMX-Y, siendo X el número de muestra desde el muestreo 1 hasta 18 (hasta 24 para el estudio de la comunidad procarriota) e Y el punto de muestreo (A01: influente; ANOX: cámara anóxica; AER: cámara aeróbica; MBR: reactor MBR; A09: efluente), por tanto, el código de muestra para la primera muestra tomada en la entrada sería: AVM1-A01. Para el muestreo de la biopelícula de la membrana, la codificación asignada fue AVMB, y al ser única, no recibió asignación numérica.

3.3. Análisis de variables fisicoquímicas

Durante el desarrollo de este trabajo, las variables analizadas fueron las que se muestran agrupadas a continuación como:

- Variables del influente: pH, turbidez, conductividad, SST, DQO, DBO₅, N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻, TON, NKjeldahl, NT y PT. Estas variables fueron comunes para los tres puntos del tratamiento biológico.
- Variables del efluente: pH, turbidez, conductividad, SST, DQO, DBO₅, N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻, TON, NKjeldahl, NT y PT.
- Variables operacionales: SSLM, SSVLM, V30, pH, T^a, TRH y TRC. Estas variables se midieron en la cámara aeróbica y se han considerado las mismas para los tres puntos del tratamiento biológico.

Es conveniente especificar que el tiempo de retención hidráulico (TRH) es el tiempo de permanencia del agua residual en las cámaras de aireación, en nuestro caso este valor es de unas 8 horas. Se calcula dividiendo el volumen total de los tanques de aireación (m³) entre el caudal horario de un día ((m³/día)/24) (Emaya, 2018). El tiempo de retención celular (TRC) o edad del Fango (Ef) es la relación entre la masa de fangos existentes en la cámara aeróbica y la masa de

fangos extraídos (purga), se calcula dividiendo los kg de SSLM que hay en los tanques, entre los kg de SS eliminados por la purga de fango en un día (Emaya, 2018), según la fórmula:

$$Ef = \frac{V \times X}{Qp \times Xp}$$

En la cual:

V= volumen del reactor m³

X= SSVLM Kg/m³

Qp= Caudal de la purga de fangos m³/h

Xp= SSV de la purga de fangos Kg/m³

- Variables del reactor: N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻, TON, NKjeldahl, NT y PT. Estas variables se determinaron para cada compartimento del biorreactor, siendo únicas y específicas para cada uno de ellos.

Para más información sobre las variables ambientales analizadas, consúltese la Tabla 8.7 del Anexo. La metodología empleada para la determinación de cada uno de estos parámetros fue la que se muestra en la Tabla 3.1.

Tipo de variable fisicoquímicas	Parámetro	Método
Influente y Efluente	pH	Potenciometría
	Turbidez	Nefelometría
	Conductividad	Celda de conductividad
	SST	Gravimetría
	DQO	REDOX potenciométrica/Volumetría (en la EDAR)
	DBO ₅	Oximetría con sistema OXITOP®
	N-NH ₄ ⁺	Espectrofotometría de absorción molecular UV-Vis
	N-NO ₂ ⁻	Espectrofotometría de absorción molecular UV-Vis
	N-NO ₃ ⁻	Cálculo: N-NO ₃ ⁻ =TON-NO ₂ ⁻
	TON	Espectrofotometría de absorción molecular UV-Vis
	NKjeldahl	Cálculo: NKj=NT-TON
	NT	Espectrofotometría de absorción molecular UV-Vis
	PT	Espectrofotometría de absorción molecular UV-Vis
Operacional	SSLM	Gravimetría
	SSVLM	Gravimetría
	V30	Decantación/Sedimentación
	pH	Potenciometría
	T ^a	Termometría
Reactores	N-NH ₄ ⁺	Espectrofotometría de absorción molecular UV-Vis
	N-NO ₂ ⁻	Espectrofotometría de absorción molecular UV-Vis
	N-NO ₃ ⁻	Cálculo: N-NO ₃ ⁻ =TON-NO ₂ ⁻
	TON	Espectrofotometría de absorción molecular UV-Vis
	NKjeldahl	Cálculo: NKj=NT-TON
	NT	Espectrofotometría de absorción molecular UV-Vis
	PT	Espectrofotometría de absorción molecular UV-Vis

Tabla 3.1: Parámetros fisicoquímicos analizados para cada conjunto de variables, así como las técnicas empleadas para su determinación.

El análisis de las variables referentes al influente, el efluente y los compartimentos del biorreactor los realizó el doctorando en las instalaciones del Canal de Isabel II, y las variables operacionales se determinaron en las instalaciones de la propia EDAR. Todos los procedimientos están basados en Métodos Normalizados de Trabajo para análisis de aguas potables y residuales (APHA, 1992; Clesceri et al., 1989). Cabe destacar, además, que todos los parámetros analizados en los laboratorios del Canal de Isabel II se realizaron cumpliendo con los requisitos de la norma internacional UNE EN ISO/IEC 17025:2005 (AENOR, 2005), contando con la acreditación de la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) y siguiendo las especificaciones de las normas de gestión UNE EN ISO 9001:2015 (AENOR, 2015b), UNE EN ISO 14001:2015 (AENOR, 2015a) y OHSAS 18001:2007 (AENOR, 2007).

3.4. Cálculo del Índice de Fango

Para evaluar la calidad del fango activo, se utilizó el índice de fango (IF) propuesto por Rodríguez y colaboradores (Rodríguez et al., 2008), que considera tanto características macro como microscópicas del fango activo muestreado y les asigna un valor numérico (Tabla 3.2).

Características macroscópicas		
Turbidez	Alta: visibilidad muy baja a través de la probeta	0
	Media	4,5
	Baja: visibilidad alta a través de la probeta	9
Flóculos en suspensión	Alta	0
	Media	4,5
	Baja	9
Sedimentabilidad	Alta: V30 < 300 mL	9
	Media: 300 mL < V30 < 800 mL	4,5
	Baja: V30 > 800 mL	0
Olor	Correcto	3
	Incorrecto	0
Características microscópicas		
Forma	Regular	4
	Irregular	0
Tamaño	Grande: > 500 μm	4
	Medio: 150-500 μm	7
	Pequeño: < 150 μm	0
Estructura	Compacta	18
	Media	9
	Abierta	0
Textura (por punción)	Fuerte	4
	Débil	0
Cobertura	<10 %	0
	10-50 %	7
	>50 %	3,5
Filamentos en flóculo	>20	0
	5 a 20	7
	<5	14
Filamentos en disolución	Alta	0
	Baja	3
Diversidad de protistas	> 7 sp	13
	4 a 7 sp	7
	<4 sp	0
Índice de fango		

Tabla 3.2: Características macroscópicas y microscópicas del fango activo consideradas para el cálculo del IF.

El IF oscila entre valores de 0 a 100. Permite la evaluación de la calidad del fango dado que la puntuación queda dividida en diferentes categorías: 0-19 pésimo; 20-39 malo; 40-59 regular; 60-79 bueno y 80-100 óptimo (Jiménez, 2001).

3.4.1. Características macroscópicas del fango activo

En primer lugar, se valoró la sedimentabilidad, para lo que se depositaron 1000 mL de fango activo en una probeta de 1 L y durante 30 minutos, a intervalos de 5 minutos, se determinó la sedimentación de los sólidos fácilmente decantables (en mL) (APHA, 1992).

Asimismo, se evaluaron la turbidez del clarificado, los flóculos en suspensión y el olor de la muestra, asignando a todos ellos los valores correspondientes en cada caso para el cálculo del IF.

3.4.2. Características microscópicas del fango activo

Se procedió posteriormente a realizar el examen de las características microscópicas (morfológicas y estructurales) del fango activo, así como de algunos componentes bióticos del mismo. Mediante observación microscópica en contraste de fases (Olympus BX50 con cámara Canon *PowerShot A620*) se evaluaron la forma, el tamaño y la estructura de los flóculos, así como la cobertura de éstos y la textura, analizada mediante la punción del cubreobjetos. Dichas observaciones fueron realizadas en alícuotas de 25 μ L de muestra, a 100 aumentos y en 10 campos seleccionados al azar. El tratamiento de imágenes se realizó con el programa *AxiVision Release 4.7*.

3.5. Recuento e identificación de protistas y micrometazoos

La cuantificación e identificación de protistas y micrometazoos en las muestras se efectuaron dentro de las 12 horas posteriores a su recogida (normalmente antes de 8 horas). Las observaciones se realizaron en un microscopio de contraste de fases Olympus BX50 con cámara Canon *PowerShot A620*.

La estimación de la densidad absoluta de protistas y micrometazoos se llevó a cabo mediante recuento directo de dos alícuotas de 25 μ L (Madoni, 1988). La densidad fue expresada en individuos por mililitro (ind/mL). Para la estimación de la densidad de pequeños flagelados se examinaron dos réplicas en la diagonal de la cámara Fuchs-Rosenthal, tomando un volumen de 25 μ L (Madoni, 1988).

Los organismos se identificaron en vivo utilizando las claves propuestas por diversos autores (Fernández-Galiano et al., 1996; Foissner et al., 1995; Foissner et al., 1992; Foissner et al., 1991a, 1991b; Rodríguez et al., 2008; Serrano et al., 2008). Los protistas y micrometazoos identificados se agruparon según la clasificación propuesta por Madoni (1992) y el GBS (Rodríguez et al., 2008) (Tabla 8.22 del Anexo). Los grupos establecidos fueron: pequeños flagelados, grandes flagelados, amebas desnudas, amebas testáceas, ciliados nadadores, ciliados reptantes, ciliados sésiles, micrometazoos y otros. En todo el estudio, se consideraron tres grupos de amebas desnudas según su tamaño celular, medido en micras (μm): amebas grandes ($>50 \mu\text{m}$), medianas (entre 20 y 50 μm) y pequeñas ($<20 \mu\text{m}$).

3.6. Determinación de la viabilidad celular bacteriana

Se utilizó el kit de **viabilidad** bacteriana *LIVE / DEAD[®] BacLight[™]* (Molecular Probes[™]) según las instrucciones del fabricante, y con el cual se determina la viabilidad celular de las bacterias en función de la integridad de sus membranas celulares utilizando los fluorocromos Ioduro de Propidio (IP) y Syto 9.

Mediante el empleo de un microscopio de fluorescencia (Olympus BX61, cámara Olympus DP71 y fuente de luz *ExFo X-cite series 120 PC*), que combina dos canales de emisión (verde y rojo) se observaron a 1000 aumentos las células teñidas de verde (Syto 9) o teñidas de rojo (Ioduro de propidio), se tomaron microfotografías de 20 campos seleccionados al azar y se visualizaron y cuantificaron las bacterias no viables (observadas en color rojo) y las bacterias viables (observadas en color verde).

La posterior cuantificación de la fluorescencia se realizó con el programa de procesamiento digital *ImageJ* (Campa, 2017; Schneider et al., 2012), que permitió determinar el porcentaje de células viables y no viables con respecto al total mediante la evaluación del valor medio de gris. Primero, las imágenes se modificaron en *Adobe Photoshop[®]* con el fin de estandarizar las dimensiones de las microfotografías en 1360 x 1024 píxeles y se guardaron en formato '.jpg', estas imágenes se cargaron en *ImageJ* y se separaron los canales verde y rojo para obtener independientemente los valores en ambos canales. A continuación, se trabajó con el valor de gris medio, es decir, el valor de gris medio dentro de la selección, esto es, la suma de los valores de gris de todos los píxeles de la selección dividida por el número de píxeles. Para

imágenes RGB, la media se calcula convirtiendo cada píxel a escala de grises mediante la fórmula: $\text{gris} = 0,299 \text{ rojo} + 0,587 \text{ verde} + 0,114 \text{ azul}$ o la fórmula: $\text{gris} = (\text{rojo} + \text{verde} + \text{azul})/3$.

3.7. Cultivo y recuento de bacterias viables cultivables

Con relación a las bacterias viables cultivables presentes en la muestra, se emplearon los siguientes medios de cultivo que permitieron tanto el recuento en grupos bacterianos determinados, enterobacterias y pseudomonadáceas, como el aislamiento de UFC y la obtención de cultivos puros.

Medios de cultivo

Luria Bertani (LB) (Bertani, 1951): se trata de un medio general en el que crecen microorganismos poco exigentes. Se empleó el medio ya preparado de la marca comercial *Fisher Scientific* (para 1 L: 10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de cloruro sódico y 12 g de agar). Se añadieron 30,5 gr de la mezcla en 1 L de agua destilada. Posteriormente, se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min y se distribuyó en placas estériles. Adicionalmente se preparó caldo LB en frascos de 250 mL que se esterilizaron en las mismas condiciones.

Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG) (Mossel et al., 1962): es un medio selectivo y diferencial para el crecimiento de enterobacterias. Se utilizó un medio de la casa comercial Sigma-Aldrich que contiene peptona, extracto de levadura, cloruro sódico, sales biliares, dextrosa, rojo neutro, cristal violeta y agar. Se introdujeron 39,5 gr del preparado por litro de agua destilada. Posteriormente, se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min y se distribuyó en placas estériles.

Pseudomonas Selective Isolation Agar (PSIA) (Krueger & Sheikh, 1987): es un medio selectivo y diferencial para el crecimiento de pseudomonadáceas. Se introdujeron 20 gr de TSA en medio litro de agua destilada y se añadió 1mL de cristal violeta al 0,1%. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min. Una vez atemperado, se adicionaron 3,5 mL de nitrofurantoína en condiciones asépticas mediante filtración por jeringa con filtro de 0,22 μm y se distribuyó en placas estériles.

A partir de 1 mL de la muestra inicial se realizó un banco de diluciones en suero salino (NaCl, 9g/L), hasta la dilución 10^{-4} . Se sembraron 100 μ L de cada dilución en superficie con asa de Digralsky en cada uno de los medios descritos y por duplicado. Las placas se incubaron en condiciones aeróbicas a 28°C durante 24 horas para el medio de cultivo LB y a 37°C durante 24 horas para los medios de cultivo PSIA y VRBG. Una vez transcurrido el periodo de incubación (24-48 h), se procedió al recuento del número de unidades formadoras de colonias por cada mililitro de muestra (UFC/mL). Los recuentos se realizaron por duplicado. La dilución empleada para el recuento varió en función de la muestra, así como del punto de muestreo, considerándose únicamente como fiables aquellas que presentaban recuentos entre 30 y 300 UFC por placa.

3.8. Estudio de la diversidad microbiana

La biodiversidad o diversidad biológica se define como “la variabilidad entre los organismos vivos de todos los ambientes, incluyendo, entre otros, los organismos terrestres, marinos y de otros ecosistemas acuáticos, así como los complejos ecológicos de los que forman parte; esto incluye diversidad dentro de las especies, entre especies y de ecosistemas” (UNEP, 1992).

La diversidad puede ser expresada como el número de especies y su abundancia relativa; la combinación de estos componentes permite obtener los denominados índices de diversidad (Magurran, 1988).

Para la estimación de la **diversidad alfa**, se ha considerado en este trabajo, tanto la riqueza absoluta, medida como riqueza de taxones (S), como la estructura, medida como el índice de heterogeneidad (índice de diversidad de Shannon-Weaver), índice de dominancia de Simpson, el índice de diversidad de Simpson y el índice de uniformidad de Buzas y Gibson.

El índice de Shannon-Weaver (Shannon & Weaver, 1949), representado como H' , mide la probabilidad de seleccionar todas las especies en la proporción en la que existen en la población. Puede considerarse como una medida de la heterogeneidad de la comunidad. Se expresa con un número positivo, que en la mayoría de los ecosistemas naturales varía entre 0,5 y 5, estando su valor normal entre 2 y 3; valores inferiores a 2 se consideran bajos en diversidad y superiores a 3 son altos en diversidad de especies. Mide el grado promedio de incertidumbre al predecir a que especie pertenecerá un individuo escogido al azar de una comunidad (Magurran,

1988; Peet, 1974). Asume que los individuos son seleccionados al azar y que todas las especies están presentes en la muestra. Adquiere valores entre cero, cuando hay una sola especie, y el logaritmo de la riqueza de taxones, cuando todas las especies están representadas por el mismo número de individuos (Magurran, 1988).

El índice de Simpson (Simpson, 1949), representado como D, es un índice de dominancia, representa la probabilidad de que dos individuos escogidos al azar pertenezcan a la misma especie (Moreno 2001), cuanto más alta sea esta probabilidad menos diversa es la comunidad. Su inverso (1-D) se considera como un buen indicador de diversidad (Feinsinger 2004).

La uniformidad (Hayek & Buzas, 1997), representada como E, está relacionada con H' por la ecuación $E=e^{H'}/S$, mediante la que se relaciona el reparto de los individuos de las distintas especies condicionado a la riqueza específica del ecosistema.

Riqueza, heterogeneidad y uniformidad han sido representadas en el gráfico SHE para cada reactor a lo largo del periodo de muestreo. El análisis SHE es una técnica que integra las contribuciones relativas de la riqueza y la uniformidad como estimaciones de la diversidad de la comunidad. SHE, por tanto, resulta de la contribución relativa de la riqueza y de la uniformidad en el índice de diversidad [$H' = \ln(S) + \ln(E)$] (Perdomo et al., 2004).

La diversidad máxima ocurre cuando todas las especies están igualmente distribuidas ($H' \text{ máx.} = \ln(S)$). La ecuación $H' = \ln(S) + \ln(E)$ indica que la diversidad H' se encuentra en su valor máximo ($\ln(S)$), cuando el valor de desuniformidad ($\ln(E)$) es pequeño debido a que $E \leq 1$ y $\ln(E) \leq 0$, en la muestra (Perdomo et al., 2004).

El cálculo de los diferentes índices de diversidad se llevó a cabo con el software PAST, versión 4.08 (Hammer et al., 2001).

La **diversidad beta** es la variación en la composición de las especies en un ecosistema (Legendre et al., 2005; Whittaker, 1960). Esta variación se ha estudiado mediante análisis canónicos entre la abundancia de las especies y las diferentes variables ambientales estudiadas (Legendre, 2008).

Uno de los pasos más decisivos en el análisis de datos de una comunidad es, sin duda, el pretratamiento de los datos biológicos y ambientales, que podría alterar considerablemente los resultados (Clarke et al., 2014; Ramette, 2007).

Para llevar a cabo el tratamiento de los datos se procedió, inicialmente, al análisis descriptivo y tratamiento preliminar de los conjuntos de variables: metadatos ambientales (variables fisicoquímicas y operacionales) y biológicos (bacterias, protistas y micrometazoos). Posteriormente, se realizó un análisis exploratorio de ambos conjuntos de variables, aplicando rutinas multivariantes de tipo no paramétrico y basadas en matrices distancia. Por último, para el análisis de interpretación ambiental, que permite relacionar ambos conjuntos de variables, se implementaron técnicas de ordenación basadas en valores propios, como es el análisis de correspondencias canónico (CCA), empleado para el estudio de la comunidad de protistas y micrometazoos, y el análisis de redundancia (RDA), empleado para el estudio de la comunidad de bacterias.

La ejecución de los modelos multivariantes se llevó a cabo con el software PAST, versión 4.08 (Hammer et al., 2001).

3.8.1. Comunidades de Protistas y Micrometazoos

Para el estudio de las comunidades de protistas y micrometazoos, todos los datos obtenidos, tanto los procedentes de las variables ambientales como los de las variables biológicas de protistas y micrometazoos, fueron sometidos a pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk (Shapiro & Wilk, 1965) y análisis de la varianza (ANOVA) o de Kruskal-Wallis (Kruskal & Wallis, 1952) para conocer su comportamiento, y así poder decidir qué análisis multivariante aplicar; para este estudio, se aplicó el de tipo no paramétrico.

Los valores de las variables ambientales fueron normalizados siguiendo el método de maximización, en el cual no se mantiene la proporcionalidad (García Cascales, 2009; Garduño Rivera et al., 2013; Márquez Rosales, 1999; Rodríguez et al., 2016). Para ello, se normaliza cada valor de cada variable aplicando la ecuación:

$$vi = \frac{Vi - \text{mínimo } Vi}{\text{máximo } Vi - \text{mínimo } Vi}$$

De donde:

V_i = vector de una variable

v_i = vector normalizado de una variable

Este método de proporción de la variable dentro del rango de operación o trabajo es de los que más se ajusta a la representación del intervalo o rango de la variable independiente analizada (Rodríguez et al., 2016).

La matriz de las abundancias absolutas de protistas y micrometazoos, se transformó mediante el Log (x+1) (Clarke et al., 2014); es una de las opciones más utilizadas en ecología microbiana, para procurar así equilibrar la contribución de las especies más abundantes y la de las más raras (Clarke & Warwick, 2001; Martín-Cereceda et al., 1996).

En el análisis de datos es importante distinguir entre la distribución de las variables que se van a contrastar. En función de su distribución, el análisis de las variables puede ser de tipo paramétrico o no paramétrico: **paramétrico** es aquel análisis en el que la población sigue una distribución conocida y no aleatoria, como por ejemplo una distribución normal en una prueba de hipótesis T-test; **no paramétrico** es aquel procedimiento en el que la población muestreada sigue una distribución libre y aleatoria (Daniel & Cross, 2018), este ha sido el que se ha implementado en este trabajo.

Las principales ventajas de la estadística no paramétrica son:

- Puede emplearse para analizar poblaciones cuya estructura no se conoce.
- La carga computacional es menor que en los procedimientos paramétricos.
- Utilización en análisis de datos a partir de clasificaciones de rangos.

Y sus desventajas:

- Son menos potentes, al no necesitar cumplir ningún requisito previo necesitan un valor del estadístico mayor para rechazar la hipótesis nula que la correspondiente prueba paramétrica.

3.8.1.1. *Análisis univariante*

La estimación de la **normalidad** se realizó mediante el estadístico de Shapiro-Wilk (Shapiro & Wilk, 1965). La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk es aplicable cuando se analizan muestras compuestas por menos de 50 elementos (muestras pequeñas). La prueba de Shapiro-Wilk (Shapiro & Wilk, 1965) devuelve un estadístico de prueba W , que es pequeño para muestras no normales, y un valor p .

La prueba **ANOVA** o análisis de varianza (Fisher, 1930) es un método estadístico que permite descubrir si los resultados de una prueba son significativos, es decir, permiten determinar si es necesario rechazar la hipótesis nula sobre la igualdad de las medias o aceptar la hipótesis alternativa; medias no iguales.

La **prueba de Kruskal-Wallis** (Kruskal & Wallis, 1952), al ser una prueba no paramétrica, no asume normalidad en los datos, en oposición al tradicional ANOVA que sí lo asume, la hipótesis nula asume que los datos vienen de la misma distribución. Una forma común en la que no se cumple este supuesto es con datos heterocedásticos. La hipótesis nula H_0 para la prueba de Kruskal-Wallis indica que las muestras se toman de poblaciones con medianas iguales.

El **análisis de correlaciones** entre los grupos/taxones de protistas y micrometazoos respecto a los parámetros físico-químicos se llevó a cabo mediante el coeficiente de correlación de rango y orden de Spearman (Martínez Ortega et al., 2009) (no paramétrico), el cual es, a su vez, el coeficiente de correlación lineal de Pearson (Olsson et al., 1982) de las filas y calculado siguiendo el modelo de Press (Press et al., 1992). El grado de significación se calculó utilizando la prueba de t de Student (Student, 1908) con dos colas y $n-2$ grados de libertad.

Los estudios univariantes se llevaron a cabo con el software PAST, versión 4.08 (Hammer et al., 2001).

3.8.1.2. *Análisis multivariante*

Cada vez con mayor frecuencia se pueden analizar grandes conjuntos de datos, utilizando para ello las técnicas multivariantes.

El **análisis de las diferencias entre grupos**, además de representar objetos en un gráfico de ordenación, permite verificar si las diferencias entre los grupos de objetos (filas) en una tabla multivariante, basadas en el conjunto de sus atributos (columnas), son significativamente diferentes, por ejemplo, para probar si las similitudes dentro de los grupos son mayores que las existentes entre los grupos. Para ello, se pueden utilizar el análisis de similitudes (ANOSIM, *analysis of similarity*), y el análisis multivariante de la varianza permutacional (PERMANOVA, *permutational multivariate analysis of variance*).

El **análisis de similitudes** (ANOSIM) es una prueba no paramétrica para determinar si existen diferencias significativas entre dos o más grupos, basándose en cualquier medida de distancia (Clarke, 1993). Las distancias se convierten en rangos. Esta prueba está basada en el método de las permutaciones en el que se van cambiando las muestras de un grupo a otro de manera aleatoria. A partir de estas permutaciones se consigue comprobar el nivel de significación de los datos. ANOSIM evalúa la importancia general de la diferencia entre grupos de muestras.

Esta función proporciona un valor p (es decir, niveles de significancia) y un valor R (es decir, la fuerza de los factores en las muestras). El valor de R varía entre 0 y 1, pudiéndose obtener valores negativos, pero siempre están cerca de 0. La prueba se basa en comparar distancias entre grupos con distancias dentro de los grupos. Un valor de R cercano a 1 indica una alta separación entre los niveles de su factor, mientras que un valor de R cercano a 0 indica que no hay separación entre los niveles de su factor (García Gómez, 2017). El valor de R puede clasificarse en los siguientes grupos: $0,75 < R < 1$ muy diferente; $0,5 < R < 0,75$ diferente; $0,25 < R < 0,5$ diferente con algo de superposición; $0,1 < R < 0,25$ similar con algunas diferencias (o superposición alta); $R < 0,1$ similar.

El hecho de realizar permutaciones con las muestras provoca que se obtenga un nuevo valor de R en cada permutación. El nivel de significación α dependerá, por tanto, del número de permutaciones realizadas: si el número de permutaciones es de 1000, α equivale a 0,05, por

el contrario si el número de permutaciones realizadas es de 5000 el nivel significativo disminuirá hasta 0,01 (García Gómez, 2017). En este trabajo, la prueba de ANOSIM se ejecutó con 1000 permutaciones.

En el caso de las variables fisicoquímicas, los análisis se ejecutaron utilizando el índice de similitud euclídea, mientras que para las variables biológicas se utilizó el índice de similitud/disimilitud de Bray-Curtis (Bray & Curtis, 1957).

El **análisis de la varianza permutacional** (PERMANOVA) (Anderson, 2001), es una prueba no paramétrica de diferencia significativa entre dos o más grupos, basada en cualquier medida de distancia (Anderson, 2001). Este algoritmo permite medir la respuesta simultánea de una o varias variables frente a uno o varios factores en un diseño experimental ANOVA, usando el análisis de permutaciones. PERMANOVA calcula un valor F en analogía con ANOVA. La significación se calcula mediante la permutación de la pertenencia al grupo, con 9999 réplicas.

En el caso de las variables fisicoquímicas, los análisis se ejecutaron utilizando el índice de similitud euclídea, mientras que para las variables biológicas se llevó a cabo utilizando el índice de similitud/disimilitud de Bray-Curtis (Bray & Curtis, 1957). Todos los estudios de similitudes se realizaron con el software PAST, versión 4.08 (Hammer et al., 2001).

El **análisis de porcentajes de similitudes** (SIMPER), es un método simple para evaluar qué taxones son los principales responsables de las diferencias observadas entre grupos de muestras (Clarke, 1993). Se aplicó con el objetivo de determinar las especies de protistas y micrometazoos que más contribuyeron a la similitud y disimilitud entre los biorreactores.

Esta prueba se ejecutó con la medida de similitud de Bray-Curtis (Bray & Curtis, 1957), multiplicada por 100 y agrupado por estaciones. Todos los posibles pares de muestras se comparan utilizando la medida de Bray-Curtis. En PAST, la disimilitud promedio general se calcula utilizando todos los taxones, mientras que las diferencias específicas de taxón se calculan de manera individual para cada uno de ellos.

Adicionalmente a la prueba SIMPER, se realizó la prueba de **Especies Indicadoras** o Valor Indicador (*IndVal* en PAST) (Dufrene & Legendre, 1997), que permite identificar

aquellas especies de protistas y micrometazoos que presentan una relevancia significativa para cada uno de los grupos representados; en este estudio, las estaciones del año.

Las especies indicadoras se utilizan como herramientas de evaluación de las condiciones del medio donde se encuentran (Martín-Regalado, 2019). Para Dufrêne y Legendre (Dufrene & Legendre, 1997) son las más características de cada grupo, se encuentran generalmente en un solo grupo y están presentes en la mayoría de los nichos pertenecientes a ese grupo, es decir, son las especies que presentan una preferencia por un ambiente en particular.

Este valor indicador se obtiene a partir de la especificidad y fidelidad de cada especie, a mayor densidad de la especie en las muestras de un hábitat particular habrá un mayor valor de especificidad y fidelidad y, por tanto, un porcentaje alto de presencia. Las especies con porcentajes altos se consideran mejores indicadoras porque tienen mayores probabilidades de ser detectadas en un hábitat particular, mientras que las especies raras tendrán porcentajes muy bajos. Aquellas especies con valores intermedios pueden servir como detectoras, proveen información de más de un hábitat y pueden dar nociones del sentido de los cambios en la calidad del hábitat (grado de conservación o grado de perturbación). Ambos parámetros son medidos de manera independiente para cada especie y expresados como un porcentaje. El Valor Indicador (*IndVal*) se calcula como:

$$\text{IndVal (\%)} = \text{Especificidad} \times \text{Fidelidad} \times 100$$

Donde:

Especificidad= N_{ij}/N_i

Fidelidad= N_{traj}/N_{traj}

N_{ij} es el número promedio de individuos de la especie i en el tipo de hábitat j ,

N_i es la suma del número promedio de individuos de la especie i sobre todos los tipos de hábitat,

N_{traj} es el número de áreas en el hábitat j donde está presente la especie i ,

N_{traj} es el número total de áreas en ese hábitat.

Mediante permutaciones de Monte Carlo se puede probar la significación estadística, ya que proporciona el valor de p para corroborar si el valor observado es o no diferente de lo esperado por azar (Martín-Regalado, 2019). Conceptualmente es sencillo y permite a los

investigadores identificar indicadores biológicos para cualquier combinación de tipos de hábitat o áreas de interés (McGeoch & Chown, 1998).

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

Este análisis se realiza en dos pasos (Ramette, 2007), primero se elige un coeficiente (similitud o disimilitud) para medir la asociación entre las variables (ambientales o biológicas). En segundo lugar, la matriz distancia de asociación calculada se representa en forma de árbol o como grupos de objetos.

En ecología, el potencial de dicho análisis se deriva de la existencia de diferentes tipos de coeficientes de similitud y disimilitud (Clarke et al., 2014). La elección adecuada de dichos coeficientes de asociación, ecológicamente significativos, es especialmente importante dado que afecta directamente a los valores que se utilizan posteriormente para categorizar los objetos. En el caso de explorar la relación entre objetos asociados a variables ambientales (operacionales, fisicoquímicas en las EDAR) es aconsejable utilizar la distancia euclídea, mientras que en el caso de las variables biológicas es más apropiada la distancia de Bray-Curtis (Clarke et al., 2014).

En este estudio, para calcular la similitud se utilizó el índice de Bray-Curtis (Bray & Curtis, 1957) para los taxones de protistas y micrometazoos. Para la matriz de distancias se utilizó el algoritmo UPGMA (Unweighted pair-group average), en el cual, los clústeres se unen en función de la distancia media entre todos los miembros de los dos grupos.

El **escalamiento multidimensional no métrico** (*NMDS*, *non-metric multidimensional scaling*) es una técnica exploratoria multivariante de interdependencia que permite obtener una ordenación en un número reducido de dimensiones, dos o tres. El *NMDS* es un método de ordenación basado en la distancia entre pares de variables (matriz distancia), no siendo necesario el supuesto de normalidad multivariante del conjunto de datos. Fue Sephard quien desarrolló este modelo (Shepard, 1962a, 1962b), demostrando que es posible obtener soluciones métricas

asumiendo únicamente una relación ordinal entre proximidades y distancias. Posteriormente Kruskal (1964) mejoró el modelo.

Es un algoritmo iterativo, utilizado para evaluar la bondad de ajuste de las estimaciones, denominado *stress* (Kruskal, 1964; Lugo González et al., 2013). Este *stress* no solo se incrementa cuando disminuye la dimensionalidad, sino también cuando se incrementa la cantidad de datos a analizar. Cuanto mayor sea la diferencia entre disparidades y distancias, mayor será el *stress* y por tanto el modelo será menos adecuado. Por tanto, el *stress* no es propiamente una medida de la bondad del ajuste, sino una medida de la no bondad o “maldad” del ajuste. Su valor mínimo es 0, mientras que su límite superior para n estímulos es $\sqrt{1 - \left(\frac{2}{n}\right)}$. Kruskal (Kruskal, 1964) sugiere las siguientes interpretaciones del *Stress*: 0,2 Pobre; 0,1 Aceptable; 0,05 Bueno; 0,025 Aceptable; 0,0 Excelente.

En PAST, la ponderación utiliza los valores de los datos brutos y, por lo tanto, no respeta la elección del índice de similitud. Sin embargo, funciona bien para datos ecológicos, lo que permite el trazado de especies junto con muestras. El algoritmo implementado en PAST, se basa en un nuevo enfoque desarrollado por Taguchi y Oono (Taguchi & Oono, 2005).

Este método de ordenamiento fue empleado para identificar los patrones de distribución de las variables biológicas, según los factores **biorreactor** y **estacional**.

Todos los estudios multivariantes se llevaron a cabo con el software PAST, versión 4.08 (Hammer et al., 2001).

3.8.2. *Dinámica poblacional de Protistas y Micrometazoos*

Para la realización de este estudio, se dividió la comunidad de cada sección del reactor, a su vez, clasificada en dos grupos atendiendo a la frecuencia de aparición y la abundancia relativa de cada taxón o grupo identificado.

La frecuencia de aparición, en tanto por ciento, se calculó dividiendo el número de muestreos en los que apareció un determinado taxón entre el número de muestreos realizados, multiplicado por el 100% de muestreos, en este caso dieciocho. La abundancia relativa se determinó, en porcentaje, dividiendo el número de individuos totales encontrados para cada taxón

y muestreo, entre el número total de individuos observados durante todo el periodo estudiado y multiplicado por cien. Conociendo los dos parámetros calculados y descritos anteriormente, se procedió a la división y estudio de la comunidad tal y como se detalla a continuación.

No se han tenido en cuenta aquellos taxones que presentan una frecuencia de aparición menor al 15%, un poco más baja o permisiva respecto a otros trabajos en los que el punto de corte se estableció en el 20% (Pérez-Uz et al., 2010; Zornoza, 2017); independientemente de la abundancia relativa que presentaran.

Para el estudio de la dinámica de la comunidad, ésta se dividió en dos grupos arbitrarios; por un lado, los taxones abundantes, los cuales presentan una frecuencia de aparición igual o mayor al 15% y una abundancia relativa mayor o igual al 0,3% y, por el otro, los taxones raros, que no cumplían los criterios anteriores.

Establecidos así los criterios para el estudio, se procedió al análisis univariante y multivariante del grupo de taxones abundantes frente a los cuatro grupos de metadatos, las variables ambientales.

3.8.2.1. *Análisis de Correspondencia Canónica*

Para establecer los posibles bioindicadores en el proceso de fangos activos, así como de aquellas variables ambientales que explicarían mejor la dinámica poblacional de protistas y micrometazoos, se aplicó el análisis de correspondencia canónica (CCA).

Ter Braak propuso el análisis de correspondencias canónico (ter Braak, 1987) como método de análisis multivariante directo del gradiente; donde el gradiente en las variables ambientales (temperatura, profundidad, volumen, etc.) se conoce *a priori* y las abundancias (o presencia / ausencias) de especies se consideran una respuesta a este gradiente. Los ejes de ordenación son combinaciones lineales de las variables ambientales (Legendre & Legendre, 1998), que maximiza la dispersión de las variables biológicas (ter Braak, 1987).

Es interesante conocer qué proporción de dicha variabilidad queda explicada por cada uno de los ejes, teniendo en cuenta que habrá tantos ejes como variables explicativas incluyamos en el modelo, si bien generalmente la mayor parte de la variabilidad va a quedar resumida

en los dos o tres primeros ejes. El CCA es sensible a los organismos raros presentes en ciertos lugares, mediante la ponderación de los mismos (Legendre & Legendre, 1998).

Los ejes de ordenación son elegidos en el CCA en función de las variables ambientales, imponiendo la restricción adicional de que los ejes deben ser combinaciones lineales de las variables ambientales (ter Braak, 1987). De este modo, la variación de la comunidad de organismos se relaciona directamente con la variación ambiental.

La inercia (varianza) es la parte que relaciona linealmente el grupo de frecuencias con el grupo de variables continuas, denominadas inercias en el espacio restringido (Greenacre, 2008). La proporción de inercia en cada eje es la proporción de inercia asociada al espacio de correspondencias explicada por la relación lineal entre abundancias de protistas y micrometazoos y las variables ambientales.

La prueba de permutación de Monte Carlo es una prueba de hipótesis para determinar la relación lineal entre frecuencias y variables continuas (ter Braak & Smilauer, 2002). La H_0 es que las variables no están relacionadas linealmente; si el p-valor resulta significativo, $\alpha < 0,05$, las frecuencias y las variables están linealmente relacionadas de manera significativa. En este trabajo la prueba de Monte Carlo se ejecutó con 999 permutaciones.

En el *Triplot* del CCA, que es un diagrama de dispersión, se representaron las especies y los muestreos en un mapa asimétrico y se situaron las variables ambientales según los valores de sus coeficientes en las relaciones lineales con los dos ejes principales. El tamaño de los vectores de las variables ambientales será proporcional a su incidencia/significación sobre las especies.

Este análisis se realizó paralelamente al estudio de las correlaciones de Spearman entre las variables abióticas y bióticas lo que procuró un mayor soporte visual y estadístico a los resultados, además de facilitar la comprensión de la distribución de las especies, su relación con las demás especies y con el ambiente y, en definitiva, permitió una caracterización del ecosistema.

La implementación en PAST sigue el algoritmo de autoanálisis dado por (Legendre & Legendre, 1998). Las ordenaciones se muestran como valores de sitio. Las variables

ambientales se representaron como correlaciones con los valores del sitio. Los valores que faltasen estarían respaldados por la sustitución del promedio de la columna.

Todos los estudios multivariantes de ordenación implementados para la comunidad de protistas y micrometazoos se llevaron a cabo con el software PAST, versión 4.08 (Hammer et al., 2001).

3.8.3. Comunidad microbiana procariota: Metataxonomía

En cada una de las muestras de los reactores se realizaron estudios de metataxonomía con el fin de conocer la comunidad microbiana procariota total, independientemente de que se tratara de organismos viables o no viables.

Las muestras se enviaron a la compañía Biomakers[®] para la secuenciación del gen ADNr 16S. En los laboratorios emplearon la tecnología Illumina[®] utilizando protocolos estándar. Las secuencias se seleccionaron y agruparon alrededor del 97% de las OTU utilizando el *pipeline* UPARSE (Edgar, 2013). Los estudios multivariados, ordenamientos y figuras se llevaron a cabo en un entorno “R” utilizando los métodos “Vegan” (Oksanen et al., 2017), “GUni-Frac” (Chen et al., 2012), “labdsv” (Roberts, 2013) y “ggplot2” (Wickham, 2016) de paquetes de programas informáticos.

3.8.3.1. Extracción de ADN, secuenciación y procesamiento de lecturas de amplicones

Las muestras se analizaron siguiendo una estrategia de estudio del gen ADNr 16S descrita anteriormente (de Celis et al., 2020). El ADN se extrajo utilizando kits de extracción *DNeasy PowerSoil Pro-Kit* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La región V4 del gen de ADNr 16S se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores 515F (GTGYCA-GCMGCCGCGGTAA) y 806R (GGACTACNVGGGTWTCTAAT). Las bibliotecas se prepararon según el protocolo de PCR Illumina[®] de dos pasos y posteriormente se secuenciaron, como ya se ha mencionado, mediante *Illumina[®] MiSeq* (Illumina[®], San Diego, CA, EE. UU.) utilizando 2×300 ciclos.

El algoritmo Dada2 (Callahan et al., 2016a) implementado en *pipe* R (Callahan et al., 2016) se utilizó para realizar el análisis de secuencias: eliminar ruido, filtrar, alinear pares y filtrar quimeras. La asignación taxonómica se realizó utilizando el clasificador bayesiano implementado en Dada2 utilizando como referencia la base de datos EzBioCloud ver. mtp1.5 (Yoon et al., 2017).

3.8.3.2. Análisis estadísticos

La diversidad microbiana y el análisis estadístico se realizaron utilizando paquetes R phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013), versión 1.26.144 y Vegan, versión 2.5.5 (Oksanen et al., 2019). El índice de diversidad de Simpson se calculó como una estimación de la diversidad alfa de la comunidad. La diversidad beta (diferencias entre muestras) se evaluó utilizando una matriz de disimilitud de Bray-Curtis en datos transformados por abundancia (McMurdie & Holmes, 2014) y análisis PERMANOVA. La ordenación multidimensional (NMDS) de los datos de las secuencias basadas en las diferencias de Bray-Curtis se utilizó para comparar los perfiles de ASV de las comunidades. Se realizó un análisis de redundancia (RDA) a partir de las matrices de disimilitud para comprimir la dimensionalidad en gráficos bidimensionales, lo que limita la información fisicoquímica en ellos.

El análisis de redundancia (Legendre & Legendre, 1998) toma como entrada una matriz de datos/sitio donde cada sitio presenta valores para una o más variables ambientales (independientes/explicativas), así como una serie de variables de respuesta (dependientes), en nuestro caso, abundancia de taxones. Los ejes de ordenación son combinaciones lineales de las variables independientes. El RDA presenta unos ejes restringidos por variables independientes.

También se estudió la comunidad microbiana central o “core”, definiendo a sus miembros como los ASV que aparecen en todo el conjunto de datos, independientemente de su abundancia. Se calculó la matriz de disimilitud de Bray-Curtis de la tabla de comunidad central y se calculó la distancia de la diversidad beta de las muestras a su centroide del año de muestreo utilizando la función *betadisper* del paquete Vegan (de Celis et al., 2020).

Para explorar los patrones de interacciones microbianas, se llevó a cabo un análisis de red basado en las correlaciones de rango de Spearman entre los ASV bacterianos y la abundancia de protistas y micrometazoos, manteniendo correlaciones positivas significativas. Se utilizó

la plataforma interactiva Gephi v.0.9.2 (Bastian et al., 2009) para generar diagramas de red y analizar parámetros topológicos.

3.9. Detección y cuantificación de grupos procariotas implicados en la eliminación de nitrógeno

3.9.1. Detección y cuantificación de bacterias AOB y NOB: Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

Para llevar a cabo el estudio de la abundancia relativa de los grupos bacterianos presentes en el licor mezcla implicados en la eliminación de nitrógeno (N), se recurrió a la técnica de la Hibridación Fluorescente *in situ*, FISH. Este ensayo únicamente se realizó en las cámaras anóxica y aeróbica del reactor biológico.

Mediante kits analíticos de la casa comercial Vermicom AG, se analizaron dos de los grupos de bacterias implicados en la reducción de los compuestos nitrogenados presentes en el agua residual: bacterias amonio oxidantes y bacterias nitrito oxidantes.

Esta metodología consiste en la utilización de sondas de ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) conjugadas con moléculas fluorescentes, que hibridan de forma específica con los grupos seleccionados. En este tipo de ensayo sólo serán visibles al microscopio de fluorescencia aquellas células viables. Para este ensayo se siguieron las instrucciones del fabricante. En todos los casos se realizó un control positivo de bacterias viables totales y un control negativo.

Mediante el empleo de un microscopio de fluorescencia (Olympus BX61, cámara Olympus DP71 y fuente de luz *ExFo X-cite series 120 PC*), se tomaron microfotografías de 20 campos seleccionados al azar y siguiendo las instrucciones del kit *Nitri-VIT*[®] se visualizaron y cuantificaron las bacterias viables oxidantes del amonio en rojo y las bacterias viables oxidantes de nitritos en verde. En el control positivo se observaron las bacterias viables totales en rojo y en el negativo no se observó fluorescencia.

La posterior cuantificación de la fluorescencia, al igual que en el caso del estudio de viabilidad, se realizó con el programa de procesamiento digital *ImageJ* (Campa, 2017;

Schneider et al., 2012), que permitió determinar el porcentaje de células *AOB* y *NOB* con respecto al total de bacterias viables mediante la evaluación del valor medio de gris.

3.9.2. Detección y cuantificación de bacterias *Comammox* (y *AOA*)

Para la detección y/o cuantificación específica de bacterias *Comammox* se llevaron a cabo los siguientes ensayos: *FISH*, *rtqPCR* (*real time Quantitative Polimerase Chain Reaction*), secuenciación masiva (*NGS*) y *dPCR* (*digital PCR*).

Todos estos estudios se realizaron sobre una muestra adicional de fango activo (no incluida en el plan de muestreo inicial) tomada de la cámara aeróbica el 21 de enero de 2020.

3.9.2.1. Hibridación fluorescente *in situ* (*FISH*)

La detección *in situ* mediante técnicas moleculares fluorescentes se realizó mediante la utilización de sondas ADN_r, conjugadas con moléculas fluorescentes, que hibridan de forma específica con los grupos seleccionados (género *Nitrospira* y *Candidatus Nitrospira nitrosa*). En este tipo de ensayo, de nuevo, sólo son visibles al microscopio de fluorescencia aquellas células que son viables en el momento de realizar el ensayo incluyéndose un control positivo de bacterias totales y un control negativo.

Las sondas para detectar *Nitrospira* y *Ca. Nitrospira nitrosa* empleadas en este trabajo se detallan en la Tabla 3.3.

Sonda	Nombre completo de la sonda	Secuencia (5'-3')	Posición de hibridación	Especificidad	Referencia
Ntspa662	S-G-Ntspa-662-a-A-18	GGA ATT CCG CGC TCC TCT	662 - 679	Género <i>Nitrospirae</i>	(Daims et al., 2001)
cNtspa662	-	GGA ATT CCG CTC TCC TCT	662 - 679	Competidor de Ntspa662	(Daims et al., 2001)
Ntspa476	S-*-Ntspa-0476-a-A-22	CTG CAG GTA CCG TCC GAA	476 - 494	<i>Ca. N. nitrosa</i> , <i>Ca. N. nitrificans</i>	(van Kessel et al., 2015)
cNtspa476	-	CTG GAG GTA CCG TCC GAA	476 - 494	Competidor de Ntspa476	(van Kessel et al., 2015)
Eub338I	S-D-Bact-0338-a-A-18	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	338 - 355	Dominio <i>Bacteria</i>	(Amann et al., 1990)
Eub338II	S-*-Bact-0338-b-A-18	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	338 - 355	Orden <i>Planctomyce-tales</i>	(Daims et al., 1999)
Eub338III	S-*-Bact-0338-c-A-18	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	338 - 355	Orden <i>Verrucomicro-biales</i>	(Daims et al., 1999)

Tabla 3.3: Sondas FISH empleadas para la detección de bacterias comammox. El asterisco (*) indica que la nomenclatura de la sonda se realiza acorde a Alm y colaboradores (Alm et al., 1996).

Para realizar la hibridación, se añadieron 6 µL de muestra fijada en etanol absoluto (1:1) en pocillos de un portaobjetos con máscara de teflón, verificando que la gelatinización del teflón fuese correcta, y se dejaron secar en una estufa a 37°C. Se empleó la sonda *Ntspa662* marcada con FAM (carboxifluoresceína) que hibrida con el género *Nitrospira*, la sonda *Ntspa476*, marcada con Tamra (Tetrametilrodamina), que hibrida con las bacterias *Ca. Nitrospira nitrosa* y *Ca. Nitrospira nitrificans*; y la *Eub338*, marcada con FAM, que resulta de la combinación de las sondas *Eub338*, *Eub338II* y *Eub338III* y que hibrida con el dominio *Bacteria* (van Kessel et al., 2015).

Posteriormente, se preparó la solución de hibridación en un vial de 2 mL. Esta solución contenía 360 µL de NaCl 5M, 40 µL de Tris 1M, 400 µL de formamida, 1198 µL de agua MilliQ y 2 µL de SDS, resultando un volumen final 2000 µL. A continuación, se precalentó un baño termostático a 48°C y se procedió a la deshidratación seriada de las muestras fijadas pasándolas por 3 cubetas de etanol (50%, 80% y etanol absoluto) durante 3 minutos en cada una de ellas. Después, se secaron en la estufa a 37°C durante 5 minutos.

Seguidamente, en condiciones de semioscuridad para preservar los fluorocromos, se añadieron en cada pocillo 9 μL de la solución de hibridación y 1 μL de la sonda (50 $\text{ng}/\mu\text{L}$). En nuestro caso, se utilizaron dos sondas, por lo que se preparó una mezcla para todos los pocillos que consistió en 72 μL de solución de hibridación y 8 μL de sonda, es decir, 4 μL de la *EUBB338* y 4 μL de *Ntspa476*. Dispuesto sobre un portaobjetos y dentro de un tubo Falcon™ (Fisher Scientific) de 50 mL, el proceso de hibridación se llevó a cabo durante 2 horas a 46 °C.

Durante la hibridación, se preparó una solución de lavado en un tubo Falcon™ (Fisher Scientific) de 50 mL que contenía 2.150 μL de NaCl 5M, 500 μL de EDTA 0,5M, 1000 μL de HCl Tris, 46,30 mL de agua MilliQ y 50 μL de SDS, resultando así un volumen final de 50 mL. Transcurrido el tiempo de hibridación, se introdujo el portaobjetos en la solución de lavado durante unos segundos y después se incubó en el baño termostático durante 15 minutos, a la misma temperatura. A continuación, se lavó el portaobjetos con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente y en oscuridad.

Las muestras hibridadas fueron examinadas en un microscopio Olympus BX50 (Olympus, París) equipado con una lámpara de alta presión de mercurio de 100W y un juego de filtros U-MWB, U-MWIB y U-MWIG. Previamente a la observación con el microscopio, las muestras fueron montadas con Vectashield (*Vector Laboratories, USA*), esta solución se coloca entre el portaobjetos y el cubreobjetos para evitar la pérdida de fluorescencia de las sondas. Las observaciones se realizaron a 1000x aumentos.

Este protocolo *FISH*, para la observación de las muestras, así como la adquisición de imágenes se realizaron en colaboración con el grupo del Dr. José Luis Alonso del Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente de la Universidad Politécnica de Valencia.

La posterior cuantificación de la fluorescencia se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito para la cuantificación de la viabilidad de bacterias totales en el fango activo.

3.9.2.2. *PCR cuantitativa*

Para la determinación de las presuntas bacterias *comammox* se utilizó la técnica de la *qPCR*, empleando la fluorescencia como método de detección. Para ello, se emplearon dos pares de cebadores degenerados (Pjevac et al., 2017) que permitían la amplificación de regiones específicas del ADN codificante para la enzima amonio mono oxigenasa específica de dos de los clados más representativos de estas bacterias y cuya presencia se ha descrito en aguas residuales (Pjevac et al., 2017).

El primero de los clados es el Clado A, y la pareja de cebadores empleados para obtener un amplicón de 415 pb fue:

comaA-244F: 5'TAYAAAYTGGGTSAAYTA3'

comaA-659R: 5'ARATCATSGTGCTRTG3'

El segundo de ellos es el clado B, y la pareja de cebadores empleados para obtener un amplicón de 415 pb fue:

comaB-244F: 5'TAYTTCTGGACRTTYTA3'

comaB-659R: 5'ARATCCARACDGTGTG3'

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25µL, estando compuesta por: 12µL de *Taq* polimerasa (ReadyMix™*Taq* PCR Reaction Mix with MgCl₂ de Sigma-Aldrich), 1µL de cada oligonucleótido cebador, el ADN molde a concentración de 120-200ng/50 µL, para ello se tuvo en cuenta la concentración de ADN total extraído de la muestra, y completando con agua calidad PCR hasta obtener el volumen final de 25µL. Se incluyó un control negativo de reacción al que se añadió, junto a la mezcla de la polimerasa y los cebadores, 1µL de agua calidad PCR.

El programa de amplificación utilizado para llevar a cabo esta detección es el que se detalla a continuación: se llevó a cabo con un paso de desnaturalización inicial a 94° C durante 5 min, seguido de 45 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 30 s, la hibridación del cebador se realizó a 52° C durante 45 s y la elongación a 72° C durante 1 min. El ciclo se completó con un paso de elongación final a 72° C durante 10 min.

3.9.2.3. PCR digital: bacterias *comammox* y AOA

La PCR digital es una técnica de PCR robusta que permite la cuantificación absoluta precisa y exacta de las moléculas objetivo mediante la dilución y partición de las muestras en numerosos compartimentos (Kanagal-Shamanna, 2016).

La plataforma dPCR proporciona cuantificación absoluta a través de dilución limitante y técnicas de número más probable basadas en estadísticas de Poisson, en lugar de una curva de calibración (Hindson et al., 2011; Hindson et al., 2013). Esto conduce a una mejor repetibilidad y precisión de las moléculas diana cuantificadas.

El método para la PCR digital utilizado en este trabajo (Vogelstein & Kinzler, 1999), utilizó la fluorescencia como punto final, obviando así la electroforesis (Morley, 2014).

Se utilizaron diferentes parejas de cebadores (Jiang et al., 2020) con el propósito de abarcar la mayor variabilidad de las secuencias y conseguir la detección de los clados *comammox* en el fango activo de esta depuradora. También se incluyeron cebadores para la detección del gen *ADNr 16s*, el grupo de bacterias sNOB (bacterias nitrito-oxidantes estrictas, *strict nitrite-oxidizing bacteria*), AOB, AOA, bacterias *comammox*, así como del género *Nitrospira*; para más detalles consúltese la Tabla 3.4.

Diana	Nombre del cebador	Secuencia (5'-3') ^a	Referencia
gen <i>amoA</i> de <i>Nitrospira commammox</i> clado A	CA377f	GTGGTGGTGGTCBAAAYTA	(Jiang et al., 2020)
	C576r	GAAGCCCATRTARTCNGCC	(F. Xia et al., 2018)
gen <i>amoA</i> de <i>Nitrospira commammox</i> clado B	CB377f	GTACTGGTGGGCBAAYTT	(Jiang et al., 2020)
	C576r	GAAGCCCATRTARTCNGCC	(F. Xia et al., 2018)
gen <i>cynS</i> de sNOB	Ntspa-cynSF	TSATCGGHGTSTAYGGMG A	(Jiang et al., 2020)
		CCGTTCARSGTRATCTT- GCA	
gen <i>amoA</i> de AOA	Arch-amoAF	STAATGGTCTGGCTTA- GACG	(Francis et al., 2005)
	Arch-amoAR	GCGGCCATC- CATCTGTATGT	
gen <i>amoA</i> de AOB en filo <i>Betaproteobacteria</i>	amoA1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	(Rotthauwe et al., 1997)
	amoA2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCT TC	
gen <i>NxrB</i> de <i>Nitrospira</i>	NxrB169F	TACATGTGGTGGAACA	(Pester et al., 2014)
	NxrB638R	CGGTTCTGGTCRATCA	
gen <i>ADNr 16S</i> de Dominio <i>Bacteria</i>	341F	CCTACGGGNGGCWGCAG	(Klindworth et al., 2013)
	785R	GAC- TACHVGGGTATCTAATCC	
gen <i>amoA</i> de <i>Nitrospira commammox</i>	A189Y	GGNGACTGGGAYTTYTGG	(F. Xia et al., 2018)
	CA209f	GAYTGGGAARGAYCGNCA	
	C576r	GAAGCCCATRTARTCNGCC	

^aBases degeneradas: B, C/G/T; Y, C/T; R, A/G; N, A/T/C/G; S, C/G; H, A/C/T; M, A/C; K, G/T; W, A/T; V, G/A/C; M, A/C.

Tabla 3.4: Dianas amplificadas mediante la técnica de PCR digital.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 40 μ L, cada reacción estaba compuesta por: 13,3 μ L *QIAcuity™ EG PCR Master Mix 3x* (Qiagen), 1 μ L de cada cebador en concentración 20 μ M, 5 μ L de extracto de ADN y 19,7 μ L de agua calidad PCR. Una vez preparadas las reacciones, se traspasaron a las placas *QIAcuity™ Nanoplate 26k 24-well* que se sellaron con *QIAcuity™ Nanoplate Tray*. El termociclador utilizado fue un *QIAcuity™ One* con versión del *software* 1.0.0.84, controlado mediante el programa informático *QIAcuity™ Software Suite* versión 1.2.18.

Para la amplificación se emplearon dos programas diferentes: el primero de ellos, común para todas las parejas de cebadores excepto para el gen *NxrB* de *Nitrospira*, consistía en: 10 minutos a 95°C seguidos de 40 de ciclos de 30 segundos a 95°, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C. Para la amplificación del gen *NxrB* las condiciones fueron: 10 minutos a 95°C seguidos de 40 de ciclos de 30 segundos a 95°, 45 segundos a 55°C y 45 segundos a 72°C.

3.9.2.4. *Metataxonomía*

Para la detección de los géneros y/o especies de bacterias *comammox* se utilizaron también técnicas de secuenciación masiva siguiendo el método de Illumina® implementado por el servicio de genómica y proteómica del CAI (Centro de Apoyo a la Investigación) de la UCM, para los cuales se emplearon directamente muestras procedentes de la EDAR objeto de estudio.

Para el estudio e interpretación de los resultados se utilizó la base de datos EZBioCloud (Yoon et al., 2017). EzBioCloud es un portal de análisis y datos públicos de ChunLab cuyo trabajo se centra en taxonomía, ecología, genómica, metagenómica y microbioma de bacterias y arqueas. Además, ofrecen un servicio en la nube que incluye herramientas bioinformáticas.

3.10. Investigación sobre cepas bacterianas relacionadas con el bioensuciamiento de las membranas

3.10.1. *Selección de cepas bacterianas Gram negativas*

A partir de las placas utilizadas para el recuento de bacterias procedentes de las membranas, se eligieron aquellas colonias aisladas procedentes tanto del medio de cultivo LB, como de PSIA y VRBG, que presentaban diferentes características macroscópicas (brillo, rugosidad, extensión, pigmentación). Posteriormente se llevó a cabo una tinción Gram (Gram, 1884) y siguiendo al procedimiento de Rodríguez y Arenas (Rodríguez & Arenas, 2018), para seleccionar mayoritariamente bacterias Gram negativas, más abundantes en los reactores biológicos (Forster et al., 2002; Nielsen et al., 1999; Wagner & Loy, 2002; Wallner et al., 1995), y sobre las cuales se realizaron los posteriores estudios de adhesión y *Quorum Sensing*.

3.10.2. *Obtención y conservación de cultivos puros de las cepas seleccionadas*

Tras seleccionar las colonias de bacterias, se realizaron cinco rondas sucesivas de aislamiento en superficie en estrías con el objeto de obtener cultivos puros, en placas Petri con medio de cultivo LB. Finalmente se repitieron las tinciones Gram de cada uno de los 12 aislados para descartar posibles contaminaciones.

Una vez aisladas y purificadas las cepas, parte de la biomasa obtenida en el último pase de purificación se resuspendió en una solución de conservación compuesta por: proteosa peptona 100 (5g), caseína peptona 20 (15g), dextrosa (1g), glicerol 80% (150mL), extracto de levadura (2g), cloruro sódico (5g), citrato de sodio (1g), bisulfito sódico (0,1g) y agua desionizada (850mL), y se mantuvo en criobolas congeladas a -80°C.

3.10.3. *Identificación molecular*

A partir del cultivo puro de cada aislado seleccionado, se realizó la extracción del ADN con el kit comercial *NZY microbial gDNA Isolation kit* (NZYTECH, genes & enzymes) siguiendo las especificaciones indicadas por el fabricante. Una vez finalizado el protocolo, se realizó la cuantificación del ADN extraído mediante la medida de absorbancia (A) a 260 nanómetros (nm) utilizando, para ello, un espectrofotómetro *NanoDrop™ 2000c Spectrophotometer* (Thermo Scientific), obteniendo tanto su concentración (ng/μL), como la calidad del ADN extraído (cociente entre $A_{260\text{nm}}$ y $A_{280\text{nm}}$). El rango óptimo de este cociente está entre 1,8 y 2,0; considerándose la muestra de ADN pura.

Mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, se amplificó la región V1/V2 del gen ADNr 16s, utilizando los cebadores Y1 (5'-TGG CTC AGG ACG AAC GCT GGC GGC-3') (posición 20-43 del gen) e Y2 (5'-CCT ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3') (posición 361-338 del gen), obteniéndose un amplicón de 348 pb.

Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25μL, estando compuesta por: 12μL de Taq polimerasa (*ReadyMix™ Taq PCR Reaction Mix with MgCl₂* de Sigma-Aldrich), 1μL de cada oligonucleótido cebador a partir del stock preparado a 50μM (Sigma-Aldrich), obteniéndose un volumen de 14μL, a los que se le añadió el ADN molde a concentración de

120-200ng/50 μ L, para ello se tuvo en cuenta la concentración de ADN total extraído de cada cepa aislada, incluyendo en la reacción el volumen necesario para cumplir el criterio anterior, completando con agua calidad PCR hasta obtener el volumen final de 25 μ L.

Se incluyó un control negativo de reacción al cual se añadieron, junto a la mezcla de la polimerasa y los cebadores, 11 μ L de agua calidad PCR.

La amplificación se realizó con un termociclador *Mastercycler® egradient* (Eppendorf) en las condiciones de proceso siguientes: 95°C durante 10 min (desnaturalización inicial), 30 ciclos de 95°C durante 45 s (desnaturalización), 58°C durante 1 min (anillamiento) y 72°C durante 45 s (extensión) y finalmente 72°C durante 10 min (extensión final).

Tras la amplificación, los fragmentos V1/V2 generados se purificaron, siguiendo las instrucciones del fabricante, con el kit de purificación *NZYGelpure* (NZYTECH, genes & enzymes) basado en el paso de los productos de PCR por columnas de sílice.

Una vez purificado el amplicón, se valoró espectrofotométricamente mediante Nanodrop™ 2000c para confirmar su presencia, así como para conocer su concentración y grado de pureza. Además, se valoró por electroforesis en gel de agarosa al 0,9% (1,08 g de agarosa de Sigma Aldrich en 150 mL tampón TAE 1x (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM), si su tamaño era acorde al fragmento de secuencia esperado (348 pb), y se verificó la ausencia de moléculas o fragmentos que pudieran estar contaminando la muestra. Para visualizar el ADN en el gel, se añadieron 2,6 μ L de *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium). El patrón de tamaño que se utilizó fue *HyperLadder™ III 500 bp* (Bioline, A Meridian Life Science® Company). En cada pocillo se añadieron 2 μ L del amplicón purificado y 5 μ L de tampón de carga con dos colorantes diferentes (azul de bromofenol y xileno cianol FF) (DNA Gel Loading Dye (6X), Thermo Fisher Scientific™).

Los productos de PCR (amplicones) se enviaron para su secuenciación a la empresa Macrogen, en una concentración igual o mayor a 20 ng/ μ L. El método de secuenciación que se utilizó fue el método de Sanger (Sanger et al., 1977).

Una vez que se recibieron las secuencias de cada una de las cepas, se procedió a su análisis y edición con diferentes programas informáticos (BioEdit (Hall, 1999), Clustal Omega

(Goujon et al., 2010; Sievers et al., 2011), Blast (Altschul et al., 1990)) para su posterior verificación frente a la base de datos con el software *on-line* Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul et al., 1990) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

3.10.4. *Determinación de la capacidad de producción de autoinductores de tipo AHL*

Para llevar a cabo estos ensayos se emplearon dos cepas biosensoras: *Chromobacterium violaceum* CV026 y *Chromobacterium violaceum* VIR07. Estas cepas modificadas permitieron detectar si las cepas aisladas procedentes de las membranas eran productoras de AHL.

Chromobacterium violaceum es una bacteria Gram negativa que crece tanto en el suelo como en el agua (de Vasconcelos et al., 2003). Cuando la densidad celular es alta, la cepa salvaje produce violaceína, un pigmento púrpura insoluble en agua con actividad antibacteriana (Lichstein & Van De Sand, 1945).

La **cepa CV026** produce la violaceína como respuesta a la presencia de AHL exógenas (Blosser & Gray, 2000), pudiendo detectar AHL de cadena lateral corta, en el rango de C4–C8, no se detectan AHL de cadena lateral de tamaño mayor a 8 átomos de carbono (McClellan et al., 1997); el receptor CviR regula la producción de violaceína. Esta cepa se ha modificado genéticamente a partir de la cepa salvaje de *C. violaceum* con el transposón mini-Tn5 (de Lorenzo et al., 1990) obteniendo un mutante violaceína-negativo, deficiente en la producción de AHL (McClellan et al., 1997). Alguna AHL de cadena larga puede, reversiblemente, inhibir la inducción de CviR dando lugar a una ausencia de pigmentación en comparación con un control (Ravn et al., 2001).

La **cepa VIR07** es un mutante deficiente en AHL para el gen *cviI* (CV4091) (Morohoshi et al., 2008), por lo que no produce violaceína. Esta cepa puede detectar una amplia gama de AHL; aunque la producción de violaceína en VIR07 se induce agregando AHL de cadena larga (C10-C16), ésta puede inhibirse agregando AHL de cadena corta (C4-C8) (Morohoshi et al., 2008). La cepa VIR07 produce violaceína cuando los AHL difunden desde bacterias productoras de AHL en placas de agar y, por lo tanto, su uso como indicadora de AHL funcional (Morohoshi et al., 2008) permite considerarla como un biosensor útil para reconocer AHL exógenos (McClellan et al., 1997).

Para verificar la capacidad sensora de las cepas de *C. violaceum* se realizaron controles empleando AHL sintéticas, con cadenas laterales con diferente número de átomos de carbono: N-hexanoil-L-homoserín lactona (C6-AHL), N-octanoil-L-homoserín lactona (C8-AHL) y N-dodecanoil-L-homoserín lactona (C12-AHL).

A partir de las cepas conservadas en viales a -80°C se procedió a su reconstitución sembrando 2 o 3 criobolas en placas Petri con medio de cultivo LB e incubándolas durante 24 horas a 28°C. Posteriormente, y a partir de la biomasa revitalizada en el paso anterior, se sembró por extensión en superficie en las placas con medio de cultivo LB, cada una de las cepas biosensoras, disponiendo en cada placa tres discos de celulosa de 6 mm de diámetro (FilterLab®) sobre los cuales se añadió 1µL de AHL C6, C8 o C12, para verificar si se inducía la producción de violaceína en el cultivo revitalizado.

Una vez verificada la capacidad de respuesta de las cepas biosensoras, se realizó el ensayo con las cepas aisladas del raspado de la membrana, para ello se sembraron estrías paralelas de cada una de las cepas biosensoras en una placa con medio de cultivo LB y perpendicularmente las cepas problema, sin entrar éstas en contacto con las cepas biosensoras, incubándose a 28°C durante 24 h. Tras la incubación se determinó si las cepas problema eran capaces de producir AHL y, por tanto, de inducir la producción de violaceína en *Chromobacterium violaceum*.

3.10.5. Ensayo de adhesión celular

Para la realización de este análisis se emplearon las cepas procedentes del muestreo de las membranas de ultrafiltración. Para ello, se inocularon en tubos de ensayo con 5 ml de medio LB líquido y se incubaron en agitación a 120 rpm durante 24 horas (h) a una temperatura de 28°C. Una vez finalizado el periodo de incubación, se midió la densidad óptica (DO) de 1 ml del cultivo utilizando el espectrofotómetro *NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific)* ajustado a 620 nm para corregir la DO del cultivo a una absorbancia de 0,1.

Para la cuantificación de la biopelícula formada se empleó la tinción con cristal violeta (CV) en placas multipocillo (Ceri et al., 1999; Christensen et al., 1985; Stepanović et al., 2000), ya que es una de las metodologías más utilizadas para la cuantificación de alto rendimiento de

biomasa de biopelícula (Djordjevic et al., 2002; Doll et al., 2016; Extremina et al., 2011; Merritt et al., 2011; Røder et al., 2015).

Se aplicó el método de O'Toole y Kolter (O'Toole & Kolter, 1998) modificado. Para ello, y empleando placas de 96 pocillos (8 x 12 filas) (Thermo Scientific), se introdujeron 100 μ L de cultivo en cada uno de los pocillos de una de las columnas realizándose, para cada cepa, 8 réplicas por experimento. Además, se añadió LB líquido en una columna (8 pocillos) como control negativo, realizándose el ensayo por duplicado. Las placas se incubaron en agitación a 120 rpm durante 24 h a una temperatura de 28°C.

Tras la incubación se retiró el medio de cultivo y se introdujeron 125 μ l de cristal violeta en cada uno de los 96 pocillos. Se dejó en contacto el cristal violeta durante 10 min y posteriormente se eliminó todo el contenido de las placas. Se realizaron tres lavados con agua MilliQ y se dejaron secar las placas durante 24 h a temperatura ambiente.

Una vez secas, se repartieron 200 μ l de ácido acético al 30% en cada pocillo dejándose en contacto durante 15 min, provocando la solubilización del cristal violeta presente en los pocillos en el ácido. Se dispensaron alícuotas de 125 μ l procedentes de cada placa en una nueva y se midió la densidad óptica en un espectrofotómetro *Varioskan lux 3020-523* de *Thermo Scientific*, y controlado mediante el programa informático *SkaniIt™ software* ver. 4.1. Los resultados se interpretaron según la propuesta de Stepanović (Stepanović et al., 2000), y utilizado por otros autores (Soler et al., 2018).

El método propuesto (Stepanović et al., 2000) distingue cuatro grupos según el grado de adherencia:

1. No adherente: **absorbancia** < absorbancia control.
2. Ligeramente adherente: absorbancia control < **absorbancia** < 2x absorbancia control.
3. Moderadamente adherente: 2x absorbancia control < **absorbancia** < 4 x absorbancia control.
4. Fuertemente adherente: **absorbancia** > 4x absorbancia control.

El control negativo empleado, el cual sirvió de referencia, fue el medio de cultivo (caldo LB) sin inocular.

Tras la obtención de la absorbancia de cada pocillo para cada cepa, se calculó el promedio y la desviación estándar de cada columna de datos, y se estableció, como criterio de calidad, que se eliminarían aquellos valores de absorbancia de cada columna que quedaran fuera de la media más dos veces la desviación estándar.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Características abióticas del sistema ecológico

Los parámetros seleccionados se determinaron con el objetivo de establecer una correlación entre éstos y la diversidad y abundancia de los microorganismos presentes tanto en el flóculo como en el licor mezcla, además de para conocer las variaciones en la calidad del agua a su paso por la depuradora, verificar que se cumplieran los requerimientos de vertido al cauce receptor del agua depurada, así como del rendimiento de depuración obtenido a lo largo del periodo de estudio recogido en este trabajo.

4.1.1. El influente

La muestra de agua se tomó a la entrada de la depuradora, después del pretratamiento, obteniéndose los siguientes valores promedio de los parámetros analizados (Tabla 4.1).

Parámetro	Unidades	Media \pm DE	Rango
pH	Ud.	7,829 \pm 0,226	7,288-8,167
Turbidez	UNF	128,712 \pm 130,185	46,8-527
Conductividad	μ S/cm	908,161 \pm 223,336	443,2-1173
SST	mg/L	241,397 \pm 201,537	91,2-764,4
DQO	mgO ₂ /L	661,315 \pm 1231,509	187,5-5556
DBO ₅	mgO ₂ /L	202,633 \pm 195,701	46,9-958
N-NH ₄ ⁺	mgN/L	38,669 \pm 15,411	14,335-77,969
N-NO ₂ ⁻	mgN/L	0,066 \pm 0,124	0-0,519
N-NO ₃ ⁻	mgN/L	0,61 \pm 0,719	0-2,53
TON	mgN/L	0,638 \pm 0,81	0-3,048
NKjeldahl	mgN/L	41,094 \pm 13,578	19,637-60,766
NT	mgN/L	41,768 \pm 13,109	21,465-61,873
PT	mgP/L	7,054 \pm 6,531	2,211-29,996

Tabla 4.1: Media, desviación estándar (DE) y rango de las variables fisicoquímicas analizadas del influente.

En el periodo estudiado y según los resultados obtenidos, la carga contaminante que llegó a la depuradora se mantuvo bastante constante. Hay que destacar que los parámetros más estables fueron el pH, el N-NO₂⁻, el N-NO₃⁻, el N-NH₄⁺ y el PT, y que aquellos que presentaron

mayor variabilidad fueron la DQO, la conductividad y los SST. Los resultados completos se pueden consultar en la Tabla 8.8 del Anexo.

El análisis de normalidad, realizado para este conjunto de datos, mostró que únicamente los parámetros pH, N-NH₄⁺, NKjeldahl y NT seguían una distribución normal ($p > 0,05$). Al incumplirse la premisa de que todas las variables siguieran la distribución normal, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis para el estudio de la varianza. El análisis realizado para estas variables mostró diferencias significativas entre las medianas de las variables, obteniéndose los siguientes resultados: H (χ^2): 66,98; p-valor: $1,14 \times 10^{-9}$.

Para conocer el grado de similitud entre los muestreos se realizó el análisis ANOSIM, con el cual se demostró que no existen diferencias significativas entre aquellos (p-valor $> 0,05$) y que, además, éstos son muy similares entre sí ($R = 0,1083$). Posteriormente, se procedió a la realización del análisis PERMANOVA, comprobándose la ausencia de diferencias significativas entre los muestreos ($F = 1,052$ y $p = 0,4905$).

4.1.2. El efluente

De igual modo que con el influente se analizó el agua muestreada a la salida de la depuradora, obteniéndose los valores promedios para cada parámetro ensayado que se muestran en la Tabla 4.2.

Parámetro	Unidades	Media \pm DE	Rango
pH	Ud.	7,51 \pm 0,164	7,112-7,85
Turbidez	UNF	0,552 \pm 0,463	0,143-2,05
Conductividad	μ S/cm	787,267 \pm 184,395	493,7-1211,7
SST	mg/L	1,218 \pm 1,47	0-3,8
DQO	mgO ₂ /L	22,489 \pm 9,414	9,8-53,4
DBO ₅	mgO ₂ /L	0,528 \pm 0,857	0-2,8
N-NH ₄ ⁺	mgN/L	0,45 \pm 1,323	0,031-5,57
N-NO ₂ ⁻	mgN/L	0,008 \pm 0,015	0-0,058
N-NO ₃ ⁻	mgN/L	9,371 \pm 3,388	3,666-15,508
TON	mgN/L	9,379 \pm 3,383	3,724-15,513
NKjeldahl	mgN/L	0,771 \pm 4,47	-10,077-15,016
NT	mgN/L	10,195 \pm 3,62	5,952-17,197
PT	mgP/L	1,156 \pm 0,654	0,222-2,699

Tabla 4.2: Media, desviación estándar (DE) y rango de las variables fisicoquímicas analizadas del efluente.

En el caso del efluente, la homogeneidad entre los valores obtenidos de cada parámetro para todo el periodo de ensayo es mayor que en el influente. Para más información consúltense la Tabla 8.9 del Anexo.

El análisis de normalidad realizado para este conjunto de datos mostró que únicamente los parámetros pH, conductividad, N-NO₃⁻, TON, NT y PT seguían una distribución normal ($p > 0,05$). Al no cumplirse la premisa de que todas las variables siguieran la distribución normal, nuevamente se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis para el estudio de la varianza. El análisis realizado para estas variables mostró que existen diferencias significativas entre las medianas de las variables, obteniéndose, para estos parámetros ambientales, los resultados de: H (χ^2): 191,20; p-valor: $2,05 \times 10^{-34}$.

Para conocer el grado de similitud entre los muestreos, se realizó el análisis ANOSIM, el cual demostró que no existen diferencias significativas entre ellos (p-valor=0,1129) y que, además, éstos son muy similares entre sí (R=0,1330). El análisis por pares de grupos, las estaciones del año, sí identifica diferencias significativas entre algunos de ellos, como es el caso de los pares verano-otoño (p=0,0310) y verano-invierno (p=0,0370). Posteriormente, se procedió a la realización de la prueba PERMANOVA obteniendo, en este caso, diferencias significativas, aunque el valor de p obtenido es más ajustado (F=3,270 y p=0,0499). Esta prueba corrobora el nivel de significancia por pares de muestreos observada en la prueba ANOSIM; verano-otoño (p=0,0273) y verano-invierno (p=0,0271).

En base a estos resultados, se confirmó que la depuración del agua residual en la planta era adecuada y cumplía con las especificaciones establecidas en su diseño y, con los requisitos de vertido que establece el RD 509/1996 (Tablas 8.4 y 8.5 del Anexo). Además, se confirmó la uniformidad en los muestreos y diferencias estacionales entre el verano respecto del otoño e invierno.

4.1.3. Rendimiento de la depuración

El rendimiento de la depuración permite verificar que la depuración es adecuada y que se cumplen respecto a los requisitos de vertido establecidos en el RD 509/1996. Se recurre a su evaluación en caso de que lleguen a la depuradora aguas residuales de características o calidades diferentes a las habituales que implicarían un “sobreesfuerzo” de tratamiento en la EDAR,

para asegurar la correcta depuración de ese influente y, en caso de no ser posible la depuración mínima obligatoria, se permitiría la depuración parcial del agua, siempre y cuando cumplieran los criterios específicos de rendimiento, igualmente establecidos en el RD 509/1996.

En la Tabla 4.3, se muestra que el rendimiento promedio de eficacia del proceso en la EDAR de Arroyo Valenoso para los parámetros contemplados en el RD 509/1196 se encuentra dentro de los límites establecidos, excepto en el último de ellos: DBO₅: 79-90%; DQO: 75%; SST: 90%; NT: 70-80%; PT: 80%. Los resultados completos se pueden consultar en la Tabla 8.10 del Anexo.

Parámetro	Unidades	Media ± DE	Rango
SST	%	99,357±0,781	97,613-100
DQO	%	93,149±4,552	81,111-99,685
DBO ₅	%	99,493±1,395	94,03-100
NT	%	73,174±15,287	19,882-88,1
PT	%	75,951±19,752	16,282-98,023

Tabla 4.3: Media, desviación estándar (DE) y rango de los rendimientos de depuración obtenidos de los parámetros contemplados en el RD 509/1996.

Al recibir la depuradora un agua residual de características bastante constantes, el rendimiento de depuración debería cumplir con lo que se establece el RD 509/1996. Esto puede resultar obvio, pero, aunque se cumpla con los criterios de concentración de vertido, podría no cumplirse el criterio de rendimiento, como es el caso del PT que, sin embargo, sí cumple en concentración, que es la primera exigencia del RD 509/1996. Ante un problema en planta o una concentración baja en el influente podría no reducirse la carga contaminante, aunque en esta depuradora con sistema de ultrafiltración, esta circunstancia no afecta a la calidad final del agua vertida al cauce receptor.

4.1.4. Variables fisicoquímicas operacionales o de control de proceso

Para el control de una estación depuradora de aguas residuales, además de conocer la calidad del agua que se recibe y la que se vierte, es preciso conocer los valores de otras variables fisicoquímicas que se miden en los reactores. Como ya se comentó en el apartado 3.3. del Capítulo 3 Materiales y Métodos, las variables fisicoquímicas operacionales o de control de

proceso analizadas fueron: SSLM, SSVLM, V30, pH, T^a, TRH y TRC. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.4.

Parámetro	Unidades	Media ± DE	Rango
SSLM	(mg/l)	3517,028±862,924	2196,5-5300
SSVLM	(mg/L)	2100,917±491,975	1306,5-2935
V30	mL	655,528±196,54	325-930
pH	Ud.	6,686±0,096	6,5-6,91
T ^a	°C	17,819±4,308	11,329-23,5
TRH	horas	54,478±11,076	28,503-68,1
TRC	días	75,236±39,138	50,63-164,04

Tabla 4.4: Media, desviación estándar (DE) y rango de las variables operacionales analizadas.

Se observa que los parámetros más variables fueron los sólidos (SSLM y SSVLM), mientras que el pH fue el parámetro más estable (Tabla 8.11 del Anexo), lo que coincide con los resultados obtenidos en el influente.

El análisis de normalidad realizado para este conjunto de datos mostró que únicamente los parámetros T^a y TRC no seguían una distribución normal ($p < 0,05$). Al no cumplirse la premisa de que todas las variables siguieran una distribución normal, nuevamente se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis para el estudio de la varianza. El análisis de la varianza Kruskal-Wallis realizado a estas variables nos demostró diferencias significativas entre las medianas de las variables, obteniéndose los resultados de: H (χ^2): 19,93; p-valor=0,0028.

Para conocer la evolución a lo largo del periodo de estudio y determinar si estos parámetros muestran diferencias significativas a lo largo del tiempo, se realizaron las pruebas ANOSIM y PERMANOVA. La primera de ellas indicó que no existen diferencias significativas entre los muestreos a nivel global ($R=0,1947$ y $p=0,0629$), pero en el estudio por pares, se observaron diferencias significativas estacionales entre primavera-verano ($p=0,0410$). La segunda de las pruebas realizadas ratificó esta significación a nivel global, al obtenerse un p-valor =0,0120 y $F=2,34207$; además, en el estudio realizado por pares de grupos (estaciones), se mostraron también diferencias significativas entre los pares primavera-verano ($p=0,0474$) y primavera-otoño

($p=0,0383$). Los resultados para los parámetros analizados de las muestras tomadas en la cámara aeróbica analizados en el laboratorio de la EDAR y empleados en el estudio de la comunidad bacteriana se pueden consultar en la Tabla 8.12 del Anexo.

4.1.5. Variables fisicoquímicas analizadas en el biorreactor: Nitrógeno y Fósforo

Otros parámetros fisicoquímicos, que hemos denominado “nutrientes”, analizados en cada uno de los tres compartimentos de los que consta el tratamiento biológico de esta EDAR (anóxico, aeróbico y MBR), mostraron los siguientes resultados:

En la **cámara anóxica**, los valores obtenidos se muestran en la Tabla 4.5.

Parámetro	Unidades	Media \pm DE	Rango
N-NH ₄ ⁺	mgN/L	8,109 \pm 2,31	3,303-12,699
N-NO ₂ ⁻	mgN/L	0,041 \pm 0,045	0,004-0,18
N-NO ₃ ⁻	mgN/L	1,879 \pm 2,06	0,121-7,632
TON	mgN/L	61,253 \pm 31,976	21,615-115,118
NKjeldahl	mgN/L	1,92 \pm 2,071	0,157-7,643
NT	mgN/L	63,137 \pm 32,276	24,549-116,198
PT	mgP/L	52,341 \pm 14,959	21,589-86,326

Tabla 4.5: Media, desviación estándar (DE) y rango de las variables Nutrientes en la cámara anóxica.

La variabilidad que se observa para estos parámetros es menor que la obtenida en el influente, siendo el TON y el NT las más variables y el N-NO₂⁻ y N-Kjeldahl las de menor variabilidad (Tabla 8.13 del Anexo).

El análisis de normalidad realizado para este conjunto de datos mostró que los parámetros pH, conductividad, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻ y TON no seguían una distribución normal ($p>0,05$). Como no todas las variables analizadas seguían una distribución normal, se aplicó, para el estudio de la varianza, la prueba de Kruskal-Wallis. El resultado de esta mostró diferencias significativas entre las medianas de las variables, obteniéndose, para este conjunto de parámetros ambientales, el siguiente resultado: H (χ^2): 16,47; p-valor: 0,0114.

El estudio de similitud entre los muestreos, realizado mediante la prueba ANOSIM, indicó que no existen diferencias significativas entre los parámetros señalados (p -valor=0,9870), siendo éstos casi idénticos entre sí por tener valor negativo (R =-0,1975). El análisis por pares de grupos no identificó diferencias entre pares. La prueba PERMANOVA realizada a continuación, corroboró la ausencia de diferencias significativas (F =0,2646 y p =0,9967). Tampoco se identificaron diferencias por pares de grupos.

En la **cámara aeróbica**, se observa una mayor variabilidad en la concentración de los parámetros TON, NT y PT. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.6.

El análisis de normalidad realizado indicó que sólo los parámetros $N-NH_4^+$ y $N-NO_2^-$ no seguían una distribución normal. La concentración de estas variables se puede consultar en la Tabla 4.6 así como en la Tabla 8.14 del Anexo.

Parámetro	Unidades	Media \pm DE	Rango
$N-NH_4^+$	mgN/L	0,866 \pm 1,294	0,081-5,367
$N-NO_2^-$	mgN/L	0,026 \pm 0,037	0,002-0,132
$N-NO_3^-$	mgN/L	6,455 \pm 3,256	1,114-14,667
TON	mgN/L	53,049 \pm 33,22	1,003-108,125
NKjeldahl	mgN/L	6,121 \pm 3,503	0-14,678
NT	mgN/L	59,109 \pm 35,232	6,24-115,371
PT	mgP/L	53,19 \pm 26,595	1,499-116,481

Tabla 4.6: Media, desviación estándar (DE) y rango de las variables Nutrientes en la cámara aeróbica.

El análisis de la varianza Kruskal-Wallis demostró diferencias significativas entre las medianas de estas variables, obteniéndose, para este conjunto de parámetros ambientales, los resultados de: H (χ^2): 26,12; p -valor: 0,0002.

El estudio de similitud entre los muestreos, mediante la prueba ANOSIM, indicó que no existen diferencias significativas entre ellos (p -valor=0,7043 y R =-0,0660). El análisis por pares de grupos no identificó diferencias entre pares. La prueba PERMANOVA posterior, corroboró la ausencia de diferencias significativas (F =0,5263 y p =0,8841). Tampoco fueron identificadas diferencias significativas por pares de grupos.

Para el último de los tres compartimentos, **el reactor MBR**, los valores de concentración que se muestran en la Tabla 4.7, indicaron una elevada variabilidad para los parámetros TON, NT y PT. Los resultados completos se muestran en la Tabla 8.15 del Anexo.

Parámetro	Unidades	Media ± DE	Rango
N-NH ₄ ⁺	mgN/L	5,1±13,585	0,124-57,069
N-NO ₂ ⁻	mgN/L	0,076±0,157	0-0,657
N-NO ₃ ⁻	mgN/L	17,996±54,789	0-230,029
TON	mgN/L	108,121±121,341	-65,619-396,032
NKjeldahl	mgN/L	17,068±53,467	0-230,686
NT	mgN/L	126,188±112,394	22,486-400,345
PT	mgP/L	111,222±74,064	25,157-330,62

Tabla 4.7: Media, desviación estándar (DE) y rango de las variables Nutrientes en el reactor MBR.

El análisis de normalidad realizado para este conjunto de datos mostró que ninguno de los parámetros analizados en este reactor sigue una distribución normal. El análisis de Kruskal-Wallis realizado a estas variables demostró que existen diferencias significativas entre las medianas de las variables, obteniéndose los resultados de: H (chi²): 83,13; p-valor: 8,03*10⁻¹⁶.

Tanto en la prueba ANOSIM como en PERMANOVA no se hallaron diferencias significativas entre los grupos estudiados, ni a nivel global ni por pares. Para ANOSIM se obtuvo R=-0,0750 y p=0,7183, y para PERMANOVA F=0,3290 y p=0,9926.

4.2. Características bióticas del sistema ecológico

4.2.1. Evaluación de la calidad del fango activo del biorreactor

4.2.1.1. Decantabilidad del fango (V30)

Este parámetro permite determinar la calidad del fango en términos de decantabilidad, es decir, de la capacidad de separación entre éste y el agua depurada. En función del volumen que el fango ocupe en la probeta tras los 30 minutos establecidos, se considera una diferente calidad que será registrada entre las características macroscópicas del fango. La decantabilidad se determinó durante todo el periodo de muestreo en cada uno de los tres compartimentos, y los valores promedios obtenidos se muestran en la Tabla 4.8; los resultados completos se pueden consultar en la Tabla 8.16 del Anexo.

Decantabilidad (V30 (mL))			
Compartimento	Anóxico	Aeróbico	MBR
Media \pm DE	572,222 \pm 213,033	612,778 \pm 263,948	927,222 \pm 92,023
Rango	270-870	0-970	640-1000

Tabla 4.8: Media, desviación estándar (DE) y rango de decantabilidad obtenidos para cada compartimento del biorreactor en los 18 muestreos realizados.

Hay que señalar que en alguno de los muestreos se produjeron circunstancias ambientales u operacionales que dieron lugar a valores de V30 diferentes a los esperados: lluvias intensas en los muestreos 13 y 16, o bajo caudal en reactor MBR en el muestreo 17 (en este caso, también se observaron espumas). En la Figura 4.1 se muestra el resultado de la decantabilidad habitual para uno de los compartimentos del tratamiento biológico.



Figura 4.1: Fotografía del resultado de la decantabilidad (V30) de una de las muestras tomadas en la cámara aeróbica.

4.2.1.2. Características macroscópicas del fango activo

En la Tabla 8.16 del Anexo se muestran los resultados de la decantabilidad, así como los valores asignados para cada una de las características macroscópicas estudiadas, en cada compartimento del tratamiento biológico, para todo el periodo en el que se desarrolló este estudio.

En la **cámara anóxica** predominaron una turbidez baja, pocos flóculos en suspensión, una sedimentabilidad media y un olor incorrecto. Hay que destacar que el olor de las muestras en esta cámara suele ser incorrecto, dado que el proceso de degradación y depuración del agua bruta, cargada de nutrientes, materia orgánica y otros compuestos como, por ejemplo, compuestos volátiles, apenas ha empezado.

En la **cámara aeróbica** predominaron una baja turbidez, pocos flóculos en suspensión, una sedimentabilidad media y un olor correcto. En lo referente a la sedimentabilidad, hay que destacar que, respecto a los sistemas más tradicionales de fangos activos, el parámetro no presentó unas características óptimas, hecho que se explica si tenemos en cuenta que esta EDAR

sustituye la decantación secundaria convencional por un reactor de membranas de ultrafiltración, por lo que este parámetro pierde relevancia.

En cuanto al olor, a diferencia de la cámara anóxica, el punto de muestreo se encuentra al final del compartimento, justo a la entrada al reactor de membranas, donde ya ha tenido lugar la eliminación de gran parte de los contaminantes del influente.

Por último, para el **reactor MBR** se obtuvieron, de manera habitual, una categoría de “baja” para la turbidez, “baja” para los flóculos en suspensión, una sedimentabilidad “baja” y un olor “correcto”.

La sedimentabilidad resultó baja, tal como se había mencionado en el apartado de decantabilidad. Teniendo en cuenta el diseño de la planta y su objetivo, este resultado era el esperado, ya que en el reactor de membranas tiene lugar la filtración del agua depurada, dando lugar al espesamiento del fango.

En la siguiente tabla (Tabla 4.9) se muestra la calificación de las características macroscópicas del IF predominantes para cada compartimento del biorreactor.

Compartimento	Turbidez	Flóculos en suspensión	Sedimentabilidad	Olor
Anóxico	Baja	Baja	Media	Incorrecto
Aeróbico	Baja	Baja	Media	Correcto
MBR	Baja	Baja	Baja	Correcto

Tabla 4.9: Categoría predominante asignada a las características macroscópicas del fango activo para los compartimentos analizados.

4.2.1.3. Características microscópicas del fango activo

Las diferentes características microscópicas analizadas (forma y tamaño del flóculo, estructura, textura, cobertura, número de filamentos en los flóculos o presencia de filamentos en suspensión y diversidad de protistas) difieren entre muestras y/o punto de muestreo, debido a las diferentes condiciones operacionales que se establecieron en cada uno de los compartimentos. Los valores asignados a estas características microscópicas para cada compartimento se pueden consultar en la Tabla 8.16 del Anexo.

Como resumen, y para facilitar la interpretación de los resultados, se recogen los valores promedios, de los tres compartimentos, en la Tabla 4.10.

Compartimento	Anóxico	Aeróbico	MBR
Forma	Regular	Regular	Regular=irregular
Tamaño	Medio	Medio	Medio
Estructura	Media	Media	Media
Textura	Fuerte	Fuerte	Fuerte
Cobertura	10-50%	10-50%	>50%
Filamentos en flóculo	5 a 20	5 a 20	5 a 20
Filamentos en disolución	Baja	Baja	Baja
Diversidad de protistas	>7 especies	>7 especies	>7 especies

Tabla 4.10: Resumen de las características microscópicas obtenidas para los tres compartimentos del biorreactor.

En la Figura 4.2 se muestran algunos de los individuos de protistas y micrometazoos observados durante el estudio de las características microscópicas del fango activo en la EDAR Arroyo Valenoso.

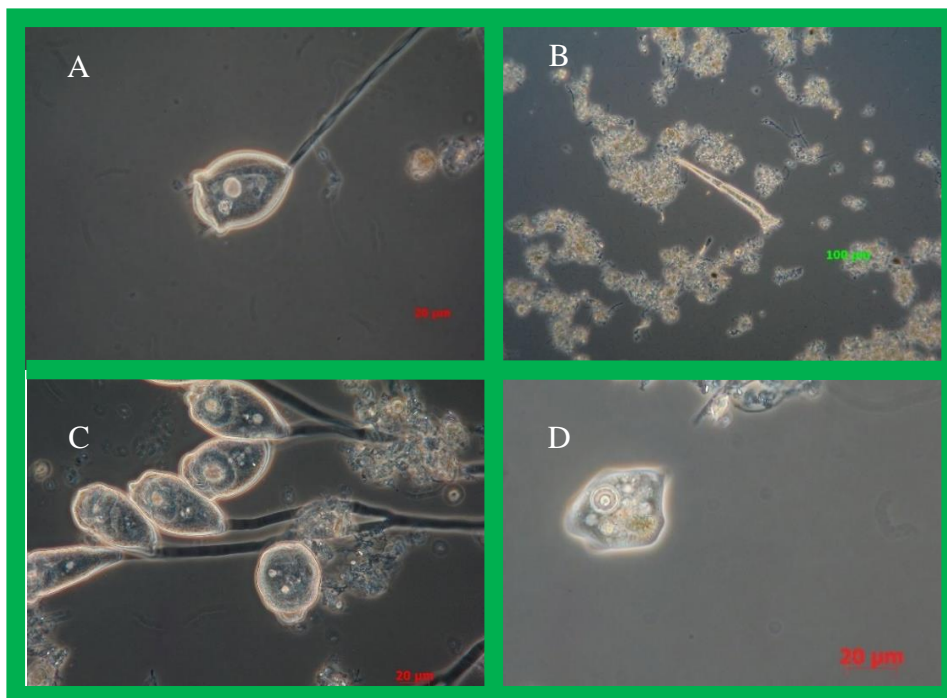


Figura 4.2: Microfotografía tomadas a 1000x. Imágenes de protistas y micrometazoos observados en el reactor biológico. A: *Vorticella convallaria*; B: *Rotífero*; C: *Epistylis sp*; D: *Ameba desnuda* de tamaño entre 20 y 50 micras.

4.2.1.4. Índice de fango

Los valores promedio del índice de fango obtenido para las cámaras anóxica, aeróbica y el reactor MBR se muestran en la Tabla 4.11. La categoría promedio obtenida para todo el periodo de muestreo es la que se indican a continuación: “Bueno” para las cámaras anóxica y aeróbica y “Regular” para el reactor MBR, en este último, el resultado no afecta a la calidad del efluente, ya que la separación del fango activo se lleva a cabo mediante ultrafiltración, por lo que este no es un parámetro comparable al obtenido en instalaciones con sistemas de tratamiento convencionales, como ya se ha comentado anteriormente.

Índice de Fango			
Compartimento	A	B	C
Promedio	65,11	70,86	59,08
DE	8,54	11,64	11,46

Tabla 4.11: Media y desviación estándar (DE) de IF obtenido para cada reactor biológico. A: cámara anóxica; B: cámara aeróbica; C: reactor MBR.

Como se observa en la Tabla 4.11, el promedio en el IF obtenido en la cámara anóxica es siempre inferior, ya que su calidad es menor en parámetros macroscópicos como el olor o la turbidez, si bien no afectan al resultado final del proceso de depuración, ya que este reactor se encuentra en cabecera de línea de agua. En la cámara anóxica, aun siendo la fase inicial del tratamiento biológico, el IF es óptimo, al igual que en la cámara aeróbica. Los resultados completos se pueden consultar en la Tabla 8.16 del Anexo.

4.2.1.5. Estudio de la viabilidad de bacterias totales del fango activo

Se realizó el estudio de la viabilidad bacteriana total en cada uno de los compartimentos del tratamiento biológico (Figura 4.3). Los resultados obtenidos se pueden consultar en la Tabla 8.17 del Anexo.

Las bacterias viables representaron, en promedio, un 79,55 % del total de bacterias en la cámara anóxica, un 72,20 % respecto a las bacterias totales en la cámara aeróbica y un 74,87% del total de bacterias en el reactor MBR, mientras que las bacterias no viables representaron, en promedio, el 20,45% en la cámara anóxica, un 27,80% y un 25,13% en la cámara aeróbica y el reactor MBR respectivamente. En la Figura 4.3 se muestra el valor medio de cada

grupo para cada reactor estudiado; observando valores muy similares en los tres reactores tanto para la proporción de bacterias viables como de no viables para todo el periodo estudiado. La comunidad bacteriana de la EDAR Arroyo Valenoso mantuvo su viabilidad a lo largo del tiempo. En la Figura 4.4 se muestran microfotografías de los flóculos marcados con IP y Syto9.

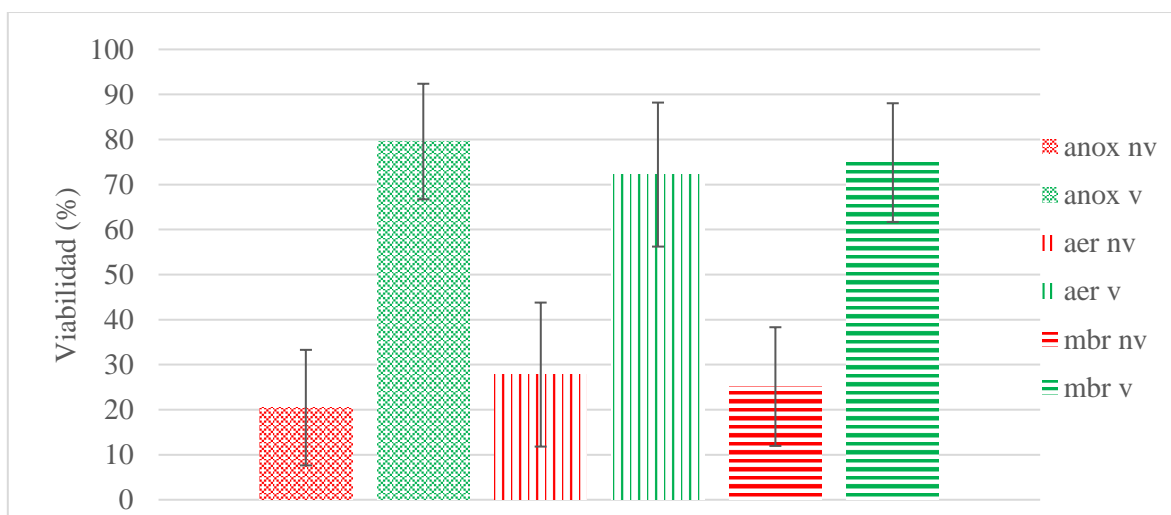


Figura 4.3: Proporción de bacterias viables (v) en verde, y no viables (nv) en rojo, en cada uno de los tres reactores biológicos del tratamiento secundario de la EDAR Arroyo Valenoso: anox: cámara anóxica; aer: cámara aeróbica y mbr: reactor mbr.

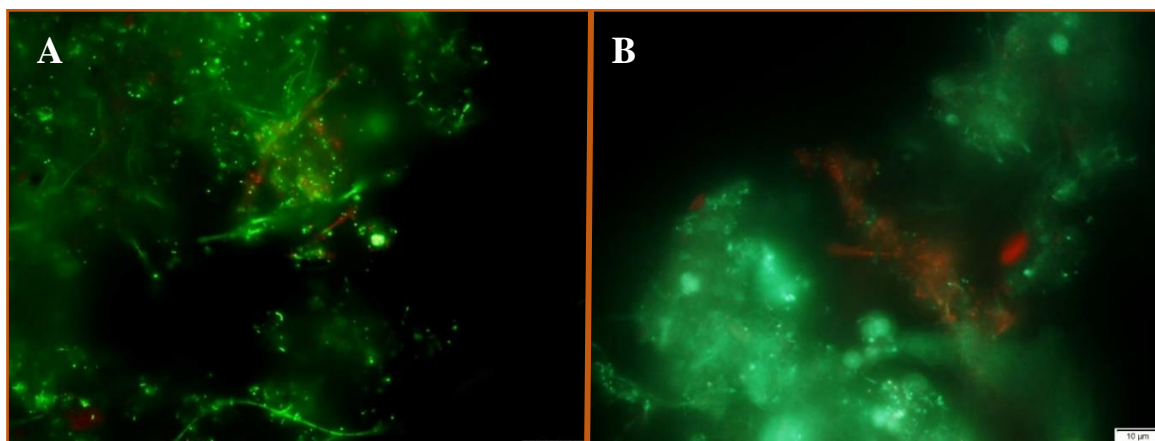


Figura 4.4: Microfotografías correspondientes a células marcadas presentes en los flóculos. Determinación de la viabilidad celular de bacterias totales. En verde, células viables marcadas con Syto9; en rojo, células no viables marcadas con IP. A, imagen perteneciente a un flóculo de la cámara anóxica de la muestra 12 a 1000x aumentos; B, imagen perteneciente a un flóculo de la cámara aeróbica de la muestra 3 a 1000x aumentos.

4.2.1.6. Recuento de bacterias totales viables cultivables

Se realizó el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC) de las dos placas de las diluciones con resultados fiables, para cada uno de los tres compartimentos del reactor biológico. Los resultados del recuento promedio para cada muestra, medio de cultivo y reactor biológico se pueden consultar en las Tablas 8.18 a 8.20 del Anexo.

Los recuentos promedio, desviación estándar (DE) y valores máximo y mínimo de las densidades obtenidas de **bacterias totales viables cultivables** realizado en medio de cultivo LB, en los tres compartimentos se muestran en la Tabla 4.12.

Compartimento	Media	DE
Anóxico	2,43E+06	1,12E+06
Aeróbico	1,22E+06	9,86E+05
MBR	4,13E+06	3,97E+06

Tabla 4.12: Valores de recuento promedio y desviación estándar (DE) obtenido en cada reactor a partir de la siembra de bacterias en el medio de cultivo LB.

Como se puede observar en la Tabla 4.12, en promedio, las densidades obtenidas para las poblaciones de bacterias se encuentran dentro del mismo orden de magnitud. La mayor variación de concentración la encontramos entre la cámara aeróbica y el MBR, en los que, considerando los valores máximo y mínimo, se detectaron fluctuaciones de hasta dos órdenes de magnitud.

En el gráfico de cajas y bigotes (Figura 4.5) se observó la dispersión de los datos, siendo mayor para el reactor MBR, con una mediana bastante centrada. En la cámara aeróbica los datos fueron muy similares entre sí y simétricos, el cuartil 75 y 25 son equidistantes de la mediana. En la cámara anóxica, la mayor parte de los datos fueron menores al valor de la media, obteniendo asimetría entre los cuartiles 25 y 75.

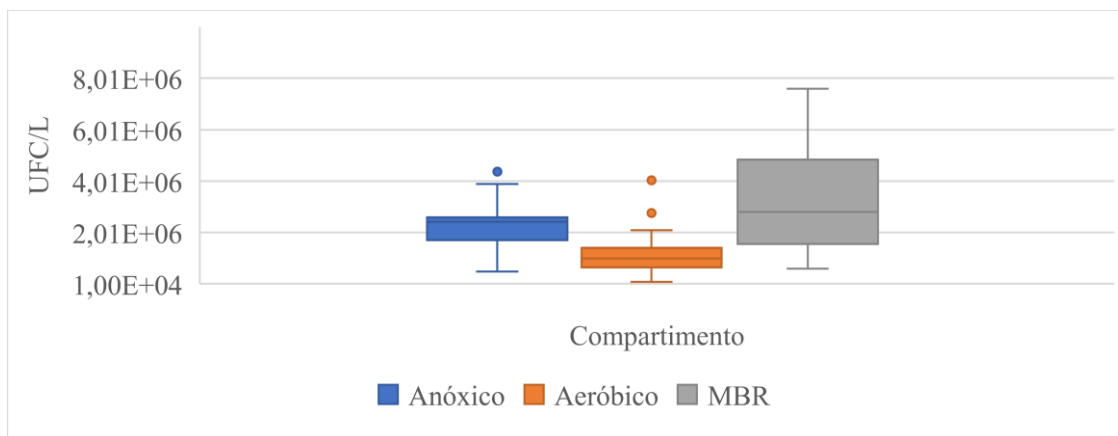


Figura 4.5: Abundancia de bacterias totales viables cultivables en cada reactor biológico. Los puntos muestran valores considerados fuera de grupo (outliers), con diferencias de más de 1,5 veces la desviación estándar.

En lo que respecta a las **enterobacterias** el recuento promedio, desviación estándar (DE) y valores máximo y mínimo de enterobacterias para cada reactor se muestra en la Tabla 4.13.

Compartimento	Media	DE
Anóxico	1,81E+05	1,60E+05
Aeróbico	9,93E+04	8,27E+04
MBR	3,30E+05	3,53E+05

Tabla 4.13: Valores de recuento promedio y desviación estándar (DE) obtenido en cada reactor a partir de la siembra de bacterias en el medio de cultivo VRBG.

Las concentraciones más elevadas se encontraron en la cámara anóxica y en el MBR, mientras que en la cámara aeróbica la concentración fue de un orden de magnitud menor. La mayor fluctuación se observó en la cámara aeróbica. La siguiente variación más acusada se obtuvo en el reactor MBR, con una diferencia de dos órdenes de magnitud, mientras que en la cámara anóxica ésta fue menor.

Para las enterobacterias, en la Figura 4.6 se observa que, para la cámara anóxica, la mayor parte de los datos son superiores a la mediana, al igual que en el reactor MBR, que presentó las abundancias más altas ($5,10 \cdot 10^5$ UFC/L); sin embargo, para la cámara aeróbica los datos son más homogéneos en torno a la mediana, observándose las concentraciones más bajas de este grupo bacteriano.

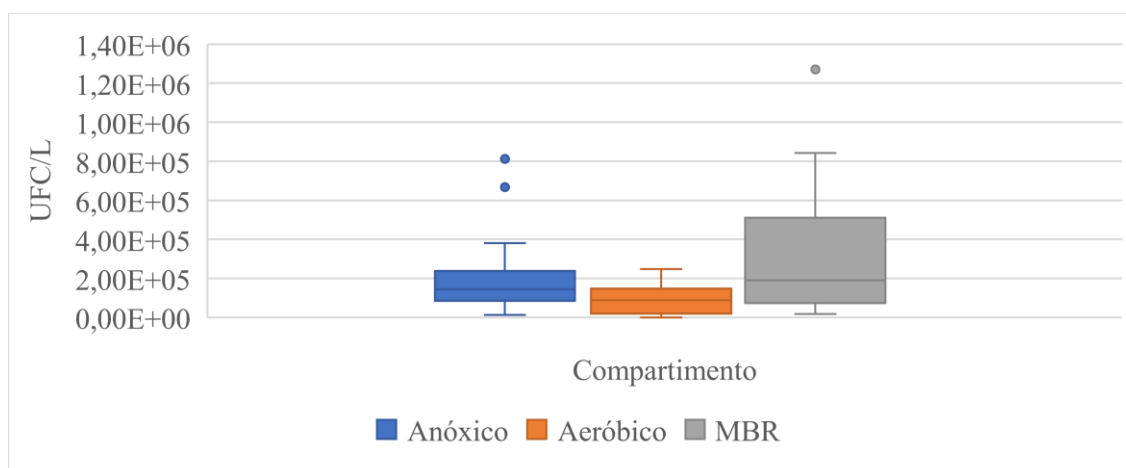


Figura 4.6: Abundancia de enterobacterias viables cultivables en cada reactor biológico. Los puntos muestran valores considerados fuera de grupo (outliers), con diferencias de más de 1,5 veces la desviación estándar.

El resultado del recuento para el grupo de las **pseudomonadáceas** se muestra en la Tabla 4.14. En este grupo bacteriano, la abundancia observada fue mucho más baja que en el grupo de las enterobacterias. La mayor concentración se observó, al igual que en los anteriores casos, en el reactor MBR, seguido de la cámara anóxica y finalmente por la cámara aeróbica, si bien en las medias presentaron el mismo orden de magnitud, los mínimos presentaron una mayor oscilación, al existir muestreos en los que el recuento de bacterias pseudomonadáceas fue de 0 UFC/L.

Compartimento	Media	DE
Anóxico	5,07E+03	5,86E+03
Aeróbico	3,37E+03	3,93E+03
MBR	8,20E+03	8,74E+03

Tabla 4.14: Valores de recuento promedio y desviación estándar (DE) obtenido en cada reactor a partir de la siembra de bacterias en el medio de cultivo PSIA.

Este fue el grupo con densidades más bajas, inferiores a $1 \cdot 10^4$ UFC/L, y con un rango menor de concentraciones (Figura 4.7).

En el gráfico de cajas y bigotes (Figura 4.7) se observa que los datos están bastante agrupados en torno a la mediana en todos los reactores, siendo la cámara aeróbica la que menor rango de datos mostró frente a la anóxica y el reactor MBR, quedando las abundancias en el anóxico predominantemente por encima de la mediana y en el reactor MBR por debajo de ésta.

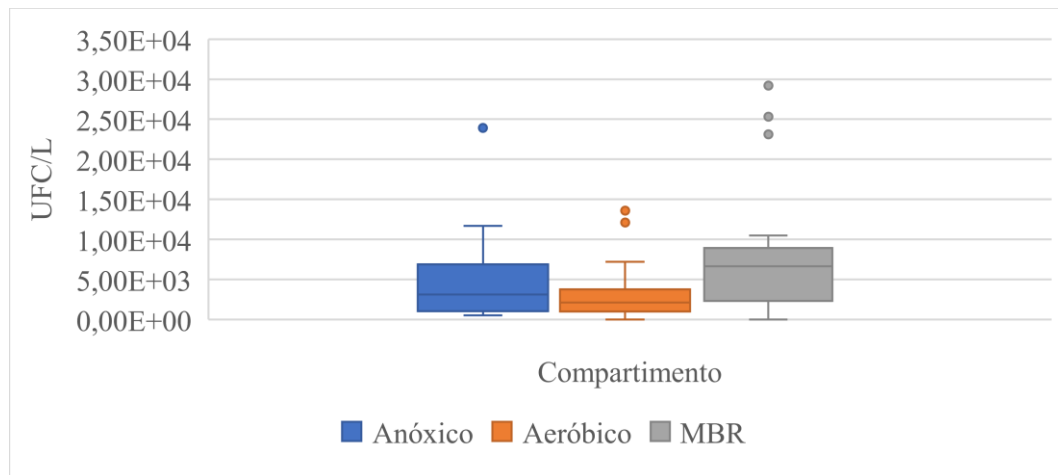


Figura 4.7: Abundancia de pseudomonádceas viables cultivables en cada reactor biológico. Los puntos muestran valores considerados fuera de grupo (outliers), con diferencias de más de 1,5 veces la desviación estándar.

A partir del recuento en cada uno de los tres compartimentos del biorreactor de las bacterias viables cultivables obtenido para cada grupo analizado, se obtuvieron las proporciones que se muestran en la Figura 4.8. No se tiene en cuenta el recuento de las bacterias totales viables cultivables obtenido a partir del crecimiento en medio de cultivo LB, ya que al ser VRBG y PSIA medios selectivos, las bacterias crecidas en estos medios también lo hacen en medio de cultivo LB y son consideradas en el total de bacterias observadas.

Las proporciones de enterobacterias más altas se encontraron en los reactores anóxicos y aeróbico, y la más alta para las pseudomonádceas se encontró en la cámara aeróbica, siendo más o menos homogénea en los reactores anóxico y MBR.

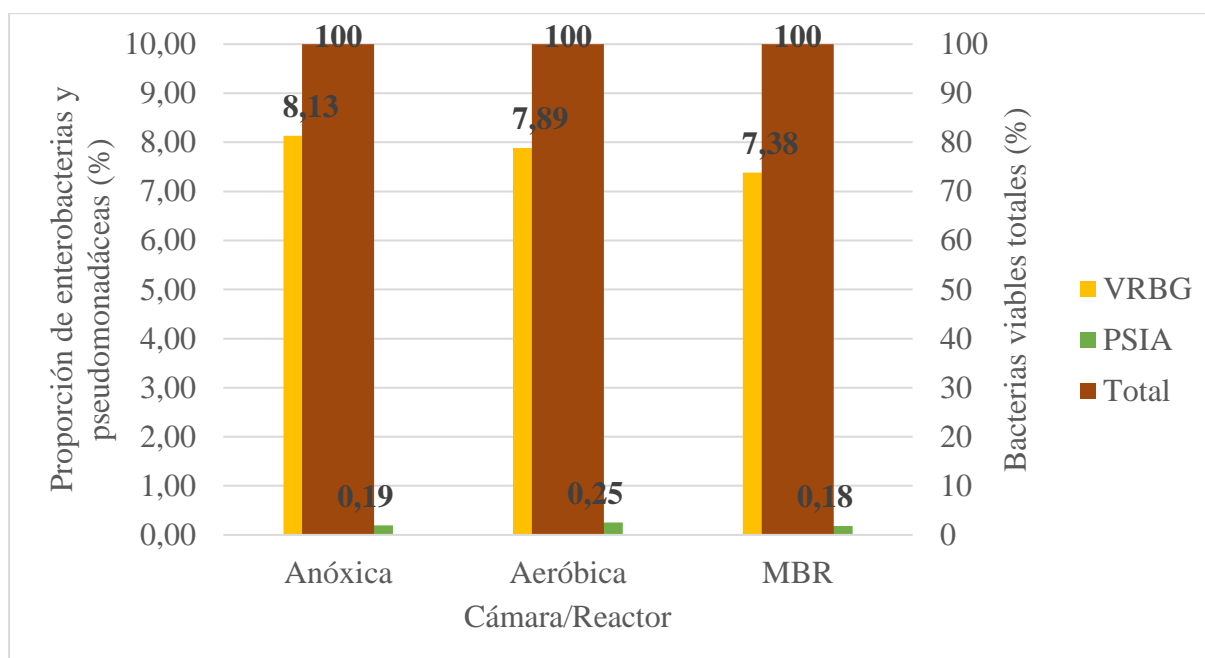


Figura 4.8: Proporción de enterobacterias (cultivadas en medio VRBG) y pseudomonadáceas (cultivadas en medio PSIA) respecto del total de bacterias heterótrofas viables cultivables (cultivadas en medio LB) en cada uno de los compartimentos del reactor biológico.

En relación con el resultado de los recuentos obtenidos para la muestra procedente del **raspado de la membrana de filtración**, para cada uno de los tres medios de cultivo ensayados, éstos se muestran en la Tabla 4.15.

Compartimento	Recuento		Media	DE
	Placa 1	Placa 2		
LB	1,40E+06	1,00E+06	1,20E+06	2,83E+05
VRBG	8,00E+05	8,00E+05	8,00E+05	0,00E+00
PSIA	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Tabla 4.15: Recuento, media y desviación estándar (DE), en UFC/L, de bacterias heterótrofas viables procedentes del raspado de la membrana para los distintos medios de cultivo empleados.

Las placas en las que se observó mayor crecimiento fueron las que contenían el medio de cultivo LB, al ser éste un medio de cultivo general, mostrando una abundancia en el mismo orden de magnitud a la observada en los recuentos del licor mezcla. El recuento fue bajo para el medio selectivo para enterobacterias, también fue en el mismo orden de magnitud que el obtenido para el licor mezcla, siendo cero en el medio de cultivo selectivo para pseudomonadáceas.

4.3. Comunidades de Protistas y Micrometazoos desarrolladas en el tratamiento biológico de la EDAR Arroyo Valenoso

4.3.1. Composición de la comunidad microbiana eucariota

En función de los criterios indicados en el apartado 3.5 Recuento e identificación de protistas y micrometazoos del Capítulo 3 Materiales y Métodos; el grupo con mayor abundancia fue el de los ciliados reptantes, grupo dominante en los tres reactores en los que presentó los valores más elevados; ciliados sésiles y amebas testáceas presentaron valores de abundancia moderadamente altos y, como en el caso anterior, la abundancia fue similar en los tres compartimentos del biorreactor. Cabe destacar que en el reactor MBR los ciliados sésiles presentaron valores de abundancia más elevados que en las otras dos cámaras. Los pequeños flagelados mostraron valores de abundancia notables y similares para los tres compartimentos. Las amebas desnudas, los ciliados nadadores, los grandes flagelados, los micrometazoos y el grupo denominado “otros” presentaron en los tres compartimentos las concentraciones más bajas (Figura 4.12). Los resultados completos pueden consultarse en la Tabla 8.21 del Anexo.

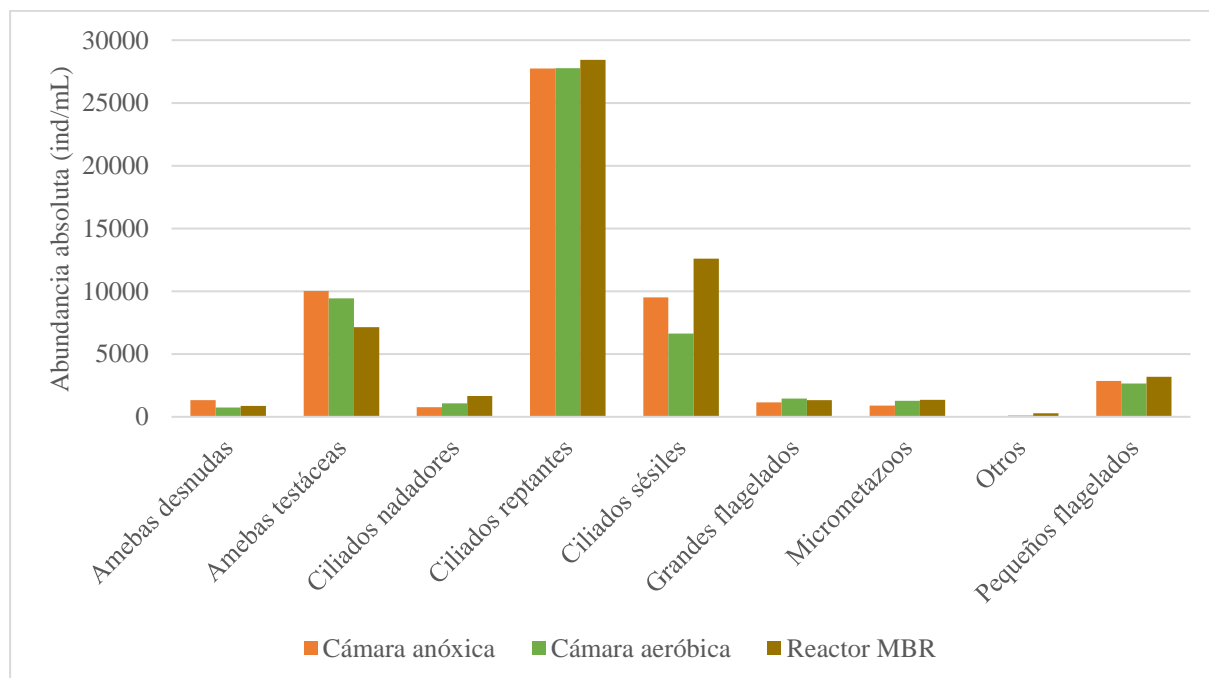


Figura 4.9: Abundancia absoluta de individuos para los diferentes grupos de protistas y micrometazoos presentes en el tratamiento biológico.

Con respecto a la presencia, los resultados concuerdan con los obtenidos respecto a la abundancia (Figura 4.10). Los ciliados reptantes fue el grupo de protistas con mayor frecuencia de aparición (igual o superior al 50%) en los tres compartimentos, mientras que, con abundancias elevadas, las amebas testáceas predominan en las cámaras anóxica y aeróbica y los ciliados sésiles en el reactor MBR.

Para el resto de los grupos, las proporciones fueron inferiores al 6%; lo cual resulta coherente con las abundancias obtenidas.

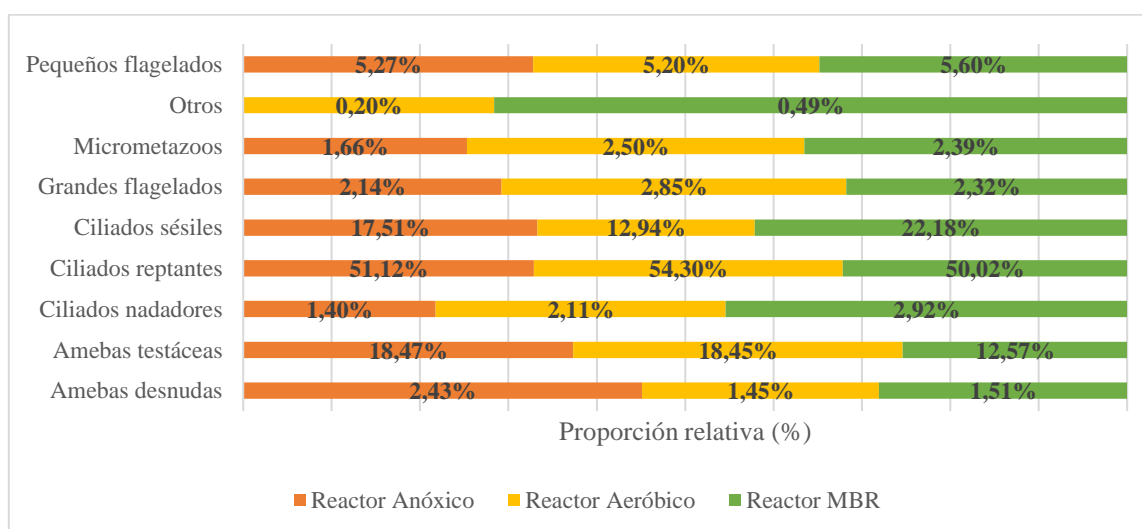


Figura 4.10: Proporción relativa de individuos para los diferentes grupos de protistas y micrometazoos identificados en el biorreactor de la EDAR Arroyo Valenoso.

En cuanto al número de taxones/grupos detectados (Figura 4.11) de los diferentes grupos funcionales y su proporción (Figura 4.12), los resultados son claramente diferentes. El grupo mejor representado en los tres casos fue el de los ciliados sésiles, seguido de los ciliados reptantes, con un menor número de especies identificadas. Las amebas testáceas constituyeron el tercer grupo respecto al número de especies, mientras que las amebas desnudas, ciliados nadadores, grandes flagelados y micrometazoos fueron menos diversos. El grupo de los pequeños flagelados sólo estuvo representado por una especie, al igual que el grupo “Otros”, a excepción de la cámara anóxica.

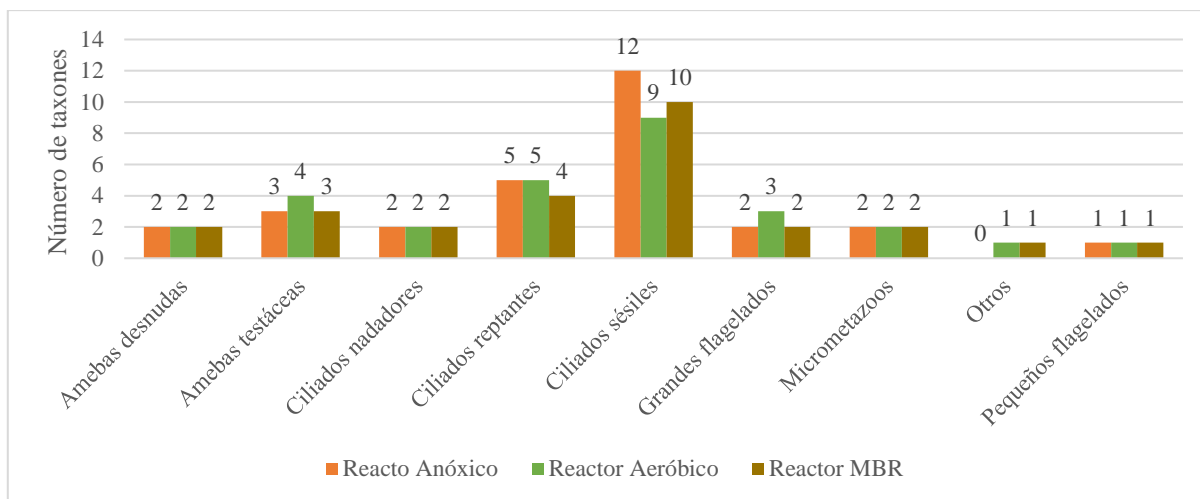


Figura 4.11: Número de taxones para los diferentes grupos de protistas y micrometazoos identificados en el biorreactor de la EDAR Arroyo Valenoso.

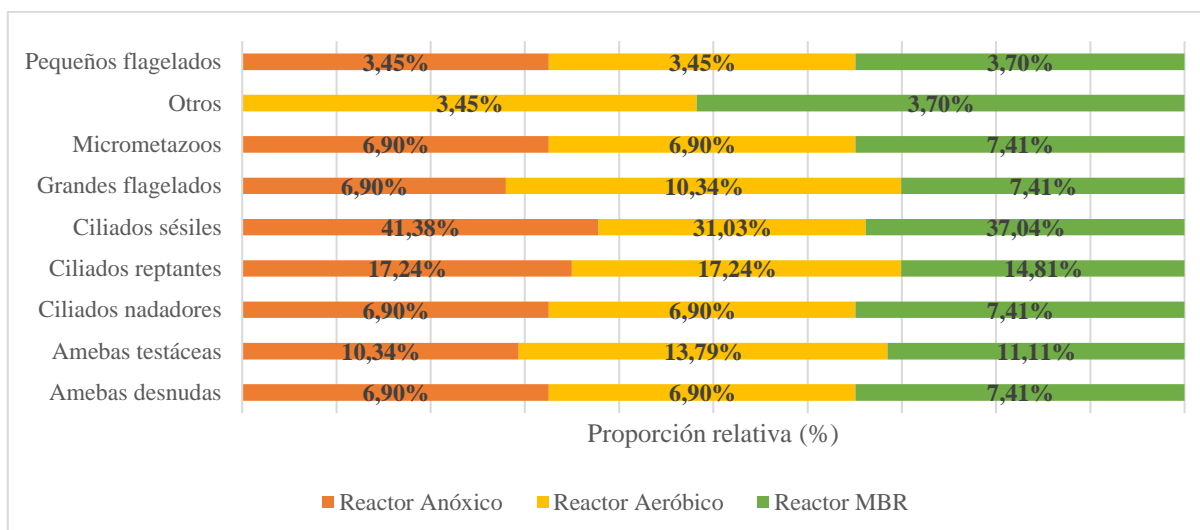


Figura 4.12: Proporción relativa de taxones para los diferentes grupos de protistas y micrometazoos identificados en el biorreactor de la EDAR Arroyo Valenoso.

4.3.2. Riqueza y abundancia de taxones y grupos eucariotas

En el estudio sobre la comunidad de estos microorganismos en los tres compartimentos que componen el tratamiento biológico en la EDAR Arroyo Valenoso, se identificaron sesenta y dos taxones/grupos de protistas y micrometazoos, de los cuales, cuarenta y nueve son de protistas, cuatro de micrometazoos, y nueve de ellos, clasificados como *Otros*, ya que no pudieron ser identificados (Tabla 8.22 del Anexo).

Para todos ellos, se calculó la abundancia absoluta (ind/mL), el promedio, la desviación estándar y el rango de abundancia, dichos resultados pueden consultarse en las Tablas 8.24 a 8.29 del Anexo.

Como ya se comentó en el Capítulo 3: Materiales y Métodos, para este estudio, solo se consideraron aquellos taxones con una frecuencia de aparición igual o superior al 15%, sin tener en cuenta su abundancia relativa.

En la **cámara anóxica**, la riqueza obtenida fue de 29 taxones que cumplían con este criterio de selección. *Trochilia minuta* fue la especie más abundante, con una gran diferencia respecto a las demás especies. *Acineria uncinata* presentó una abundancia moderada; también son reseñables otras especies como *Arcella sp*, *Epistylis spp*, *Aspidisca cicada* y *Euglypha sp* con una abundancia algo menor; estos taxones representan a los más abundantes de esta cámara. También se incluye el flagelado *Bodo saltans*; el resto de los taxones identificados presentaron densidades por debajo de los 80 ind/mL (Figura 4.13).

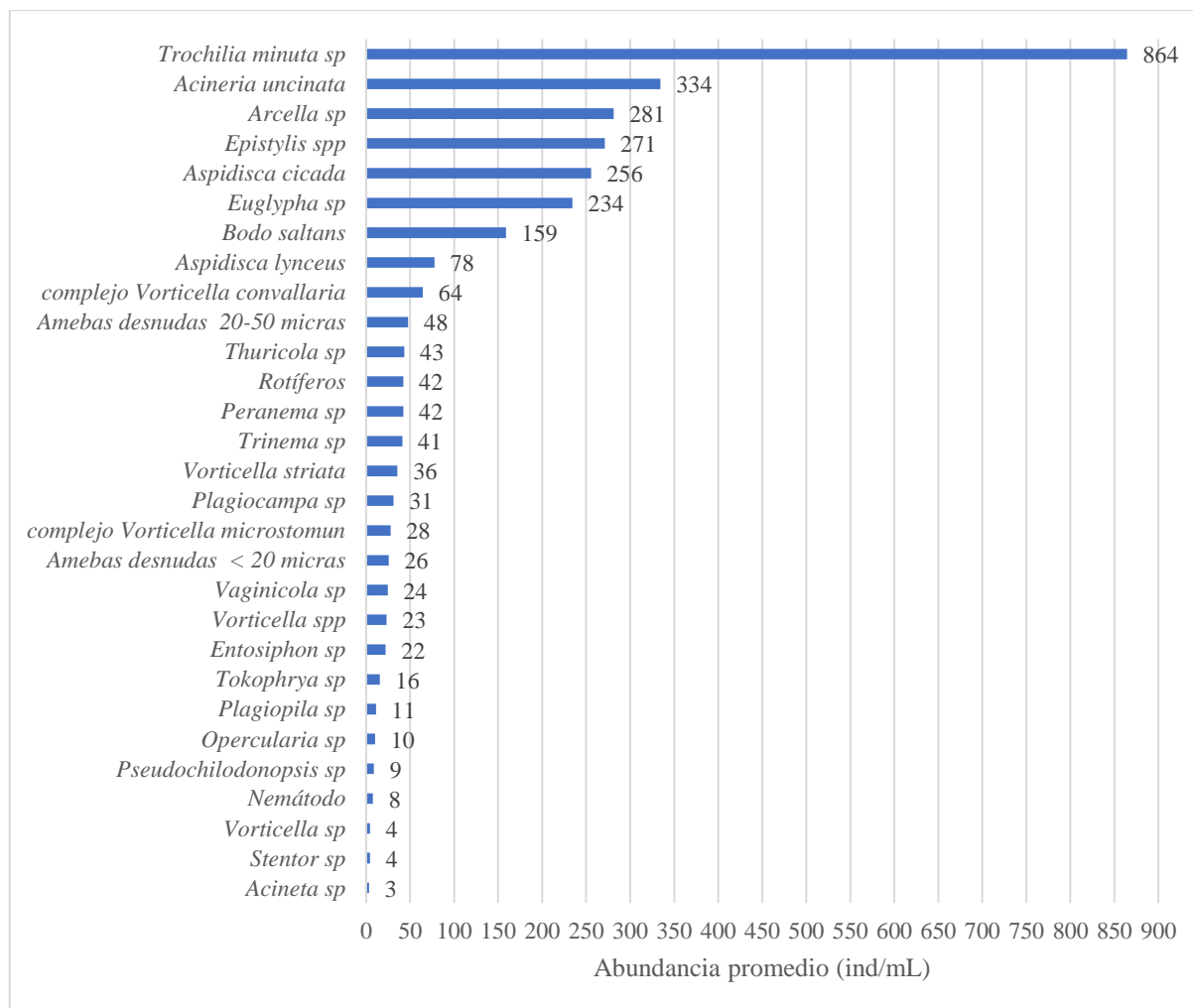


Figura 4.13: Promedio de abundancia (número de individuos/mL) para cada taxón de protistas y micro-metazoos identificados en la cámara anóxica.

En lo que respecta a la frecuencia de aparición (Figura 4.14), las diferencias entre los taxones son mucho menos acusadas. Destaca *Bodo saltans* con una frecuencia de aparición del 100%, seguido por *Aspidisca cicada* y *Euglypha sp* ambas con una frecuencia de aparición elevada, siendo estos valores acordes con los resultados de abundancia, es decir, son taxones frecuentes y abundantes, al contrario que *Bodo saltans*, que, pese a ser una especie siempre presente en el reactor, presenta siempre una abundancia baja. Otros microorganismos como los rotíferos y el complejo *Vorticella convallaria*, *Acineria uncinata* y *Arcella sp* comparten una frecuencia de aparición también destacable. Les siguen *Trochilia minuta* y las amebas desnudas de 20-50 micras, que se detectaron en dos tercios de los muestreos; seguidas de *Epistylis spp* y *Peranema sp.*, con una frecuencia media. El resto de los taxones presentaron una frecuencia de aparición inferior al 50% (véanse los resultados completos en la Tabla 8.28 del Anexo) , resultados que concuerdan con los resultados de abundancia.

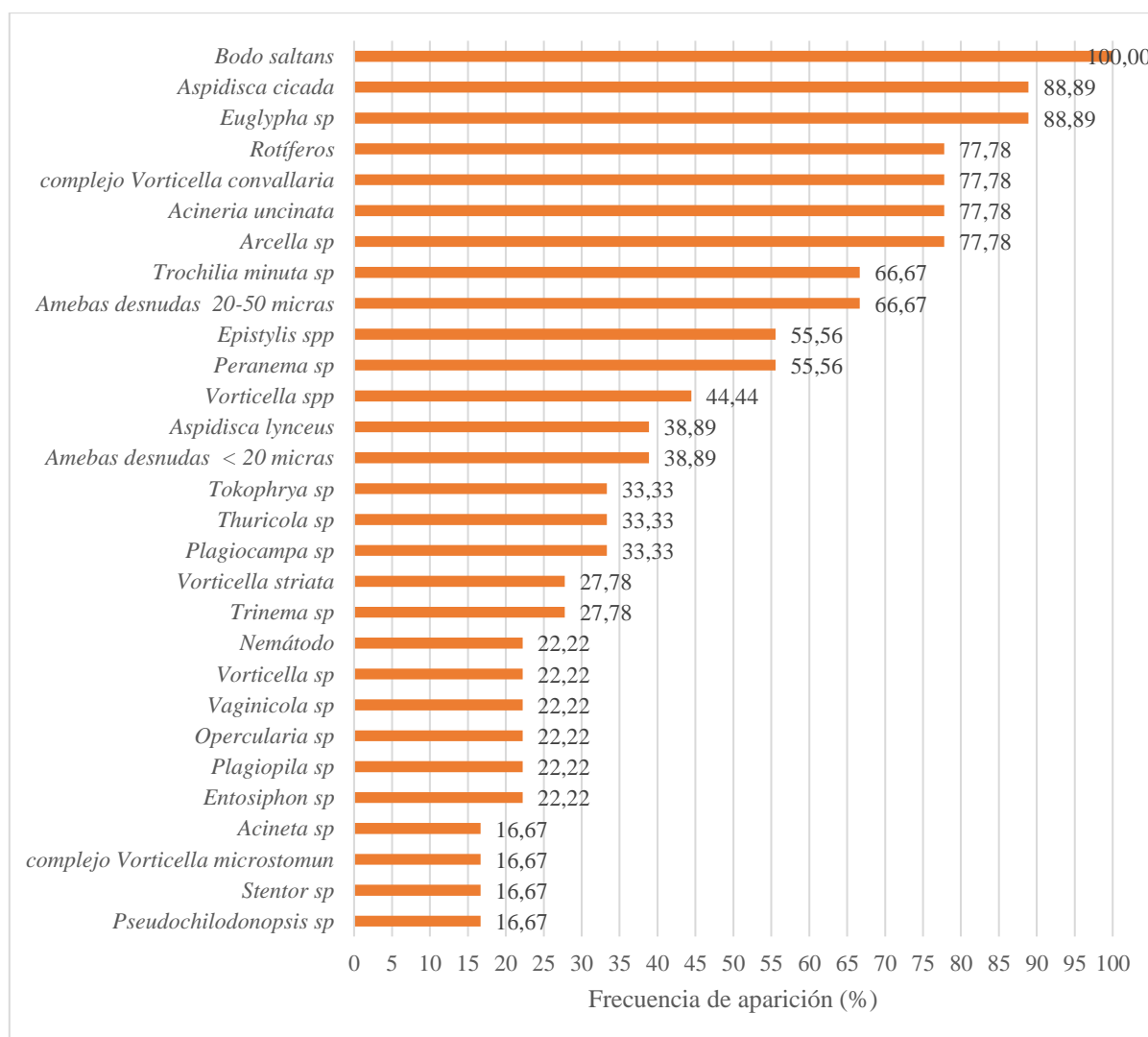


Figura 4.14: Frecuencia de aparición para cada taxón de protistas y micrometazoos identificados en la cámara anóxica.

Al igual que para la cámara anóxica, en la **cámara aeróbica** se identificaron 29 taxones que cumplieron el criterio de selección descrito anteriormente (Figura 4.15). La especie más abundante, en promedio resultó ser, nuevamente, *Trochilia minuta* con la abundancia promedio más alta, aunque menor que en la cámara anóxica, le sigue *Acineria uncinata*, con una abundancia ligeramente menor pero más alta que en la cámara anóxica. A continuación, *Aspidisca cicada* que es incluso más abundante que en la cámara anóxica. *Arcella sp.* *Euglypha sp.* *Bodo saltans* y *Epistylis spp* presentan una abundancia también destacable. Por último, *Aspidisca lynceus*, con una abundancia superior a los 100 ind/mL es la última especie con una abundancia superior a los 100 ind/mL; el resto de los taxones (Figura 4.15) presentan abundancias inferiores a 70 ind/mL.

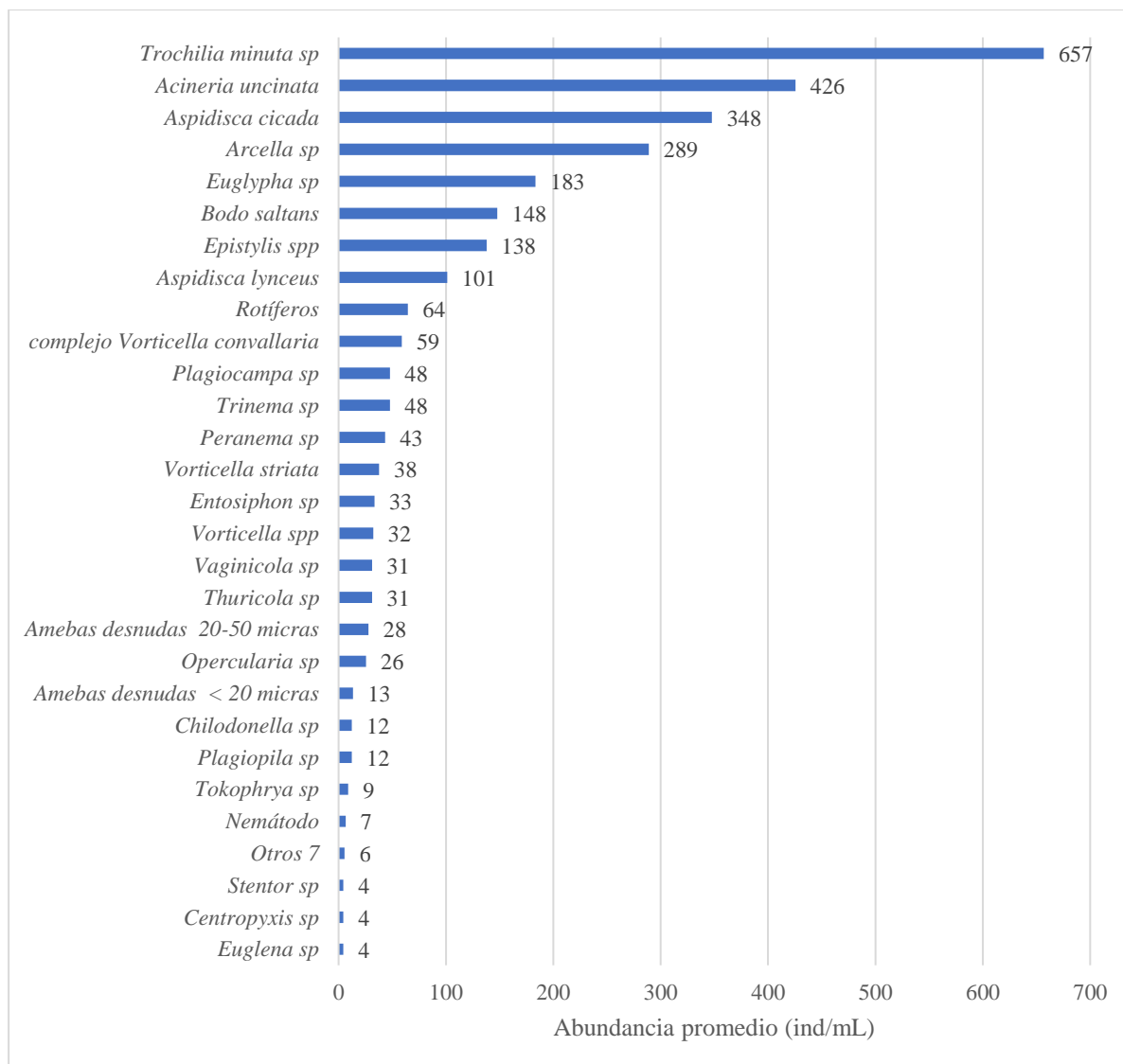


Figura 4.15: Valores promedio de número de individuos/mL para cada taxón de protistas y micrometazoos identificados en la cámara aeróbica.

En lo referente a la frecuencia de aparición de los diferentes taxones identificados en la cámara aeróbica (Figura 4.16), *Bodo saltans* nuevamente presenta una frecuencia de aparición del 100%, seguido de *Acineria uncinata* que además de abundante, es más frecuente en esta parte del reactor. Respecto a *Aspidisca cicada* y *Arcella sp*, se obtienen frecuencias de aparición concordantes con los datos de abundancia. Los rotíferos, pese a presentar abundancias bastante bajas, aparecen con la misma frecuencia que *Euglypha sp* y *Peranema sp*, si bien en este caso estamos considerando todo un grupo frente a especies concretas, por lo que no serían comparables. *Euglypha sp* fue de nuevo uno de los taxones más frecuentes y abundantes del reactor, mientras que *Peranema sp*, pese a su bajísima abundancia, está presente en casi tres cuartos de los muestreos. El complejo *Vorticella convallaria*, con una frecuencia superior a los dos tercios

de los muestreos, presentó el mismo comportamiento que *Peranema* sp, baja abundancia y una notable frecuencia de aparición. *Trochilia minuta* y las amebas desnudas de 20-50 micras, con una frecuencia de aparición semejante, mostraron un comportamiento similar al de la cámara anóxica. *Plagiocampa* sp estuvo presente en la mitad de las muestras, mientras que *Epistylis* spp y *Aspidisca lynceus* tienen frecuencias de aparición ligeramente inferiores. *Vorticella* spp, *Trinema* sp y las amebas desnudas de menos de 20 micras, así como los Nemátodos, presentaron una frecuencia de aparición moderadamente baja (Figura 4.16). El resto de los taxones (Figura 4.16), mostraron una frecuencia de aparición muy baja, menor al 30% (véanse los resultados completos en la Tabla 8.29 del Anexo), lo que concordaba con los valores obtenidos de abundancia.

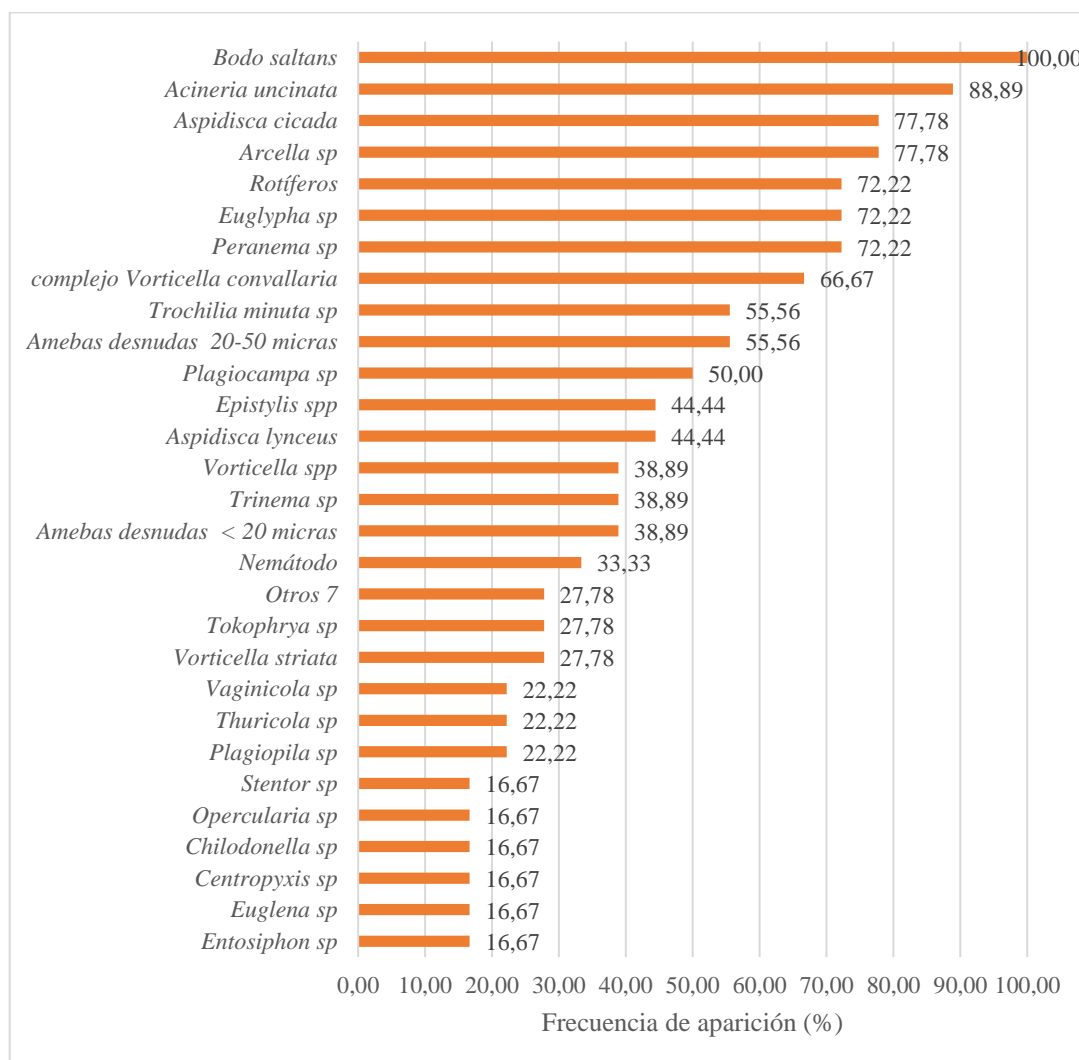


Figura 4.16: Frecuencia de aparición para cada taxón de protistas y micrometazoos identificados en la cámara aeróbica.

De igual modo que en las cámaras anóxica y aeróbica, se procedió al estudio de la abundancia absoluta de individuos por mililitro y su frecuencia relativa de aparición, en el **reactor MBR**. En esta ocasión fueron 27 taxones los que presentaron una abundancia relativa superior al 15%, dos menos que en los otros reactores.

En lo concerniente a la abundancia absoluta promedio (Figura 4.17), una vez más *Trochilia minuta* fue la especie con una mayor abundancia, siendo ésta intermedia entre los valores obtenidos para los compartimentos anteriormente analizados. *Aspidisca cicada* y *Acinertia uncinata* presentaron una abundancia intermedia, siendo la de *Aspidisca cicada* ligeramente superior. *Epistylis* spp presentó una alta abundancia, intermedia respecto a los otros compartimentos, *Arcella* sp, puede considerarse con una densidad moderadamente alta en este caso, aunque menor que en los anteriores compartimentos. El complejo *Vorticella convallaria* presentó una abundancia moderadamente alta, claramente más elevada que en los otros dos compartimentos. En este reactor, *Euglypha* sp y *Bodo saltans* mantuvieron una abundancia media, muy similar en todos los compartimentos. Por último, la especie que presentó una abundancia promedio más baja, fue *Aspidisca lynceus*, siendo también más abundante en este reactor (Figura 4.17).

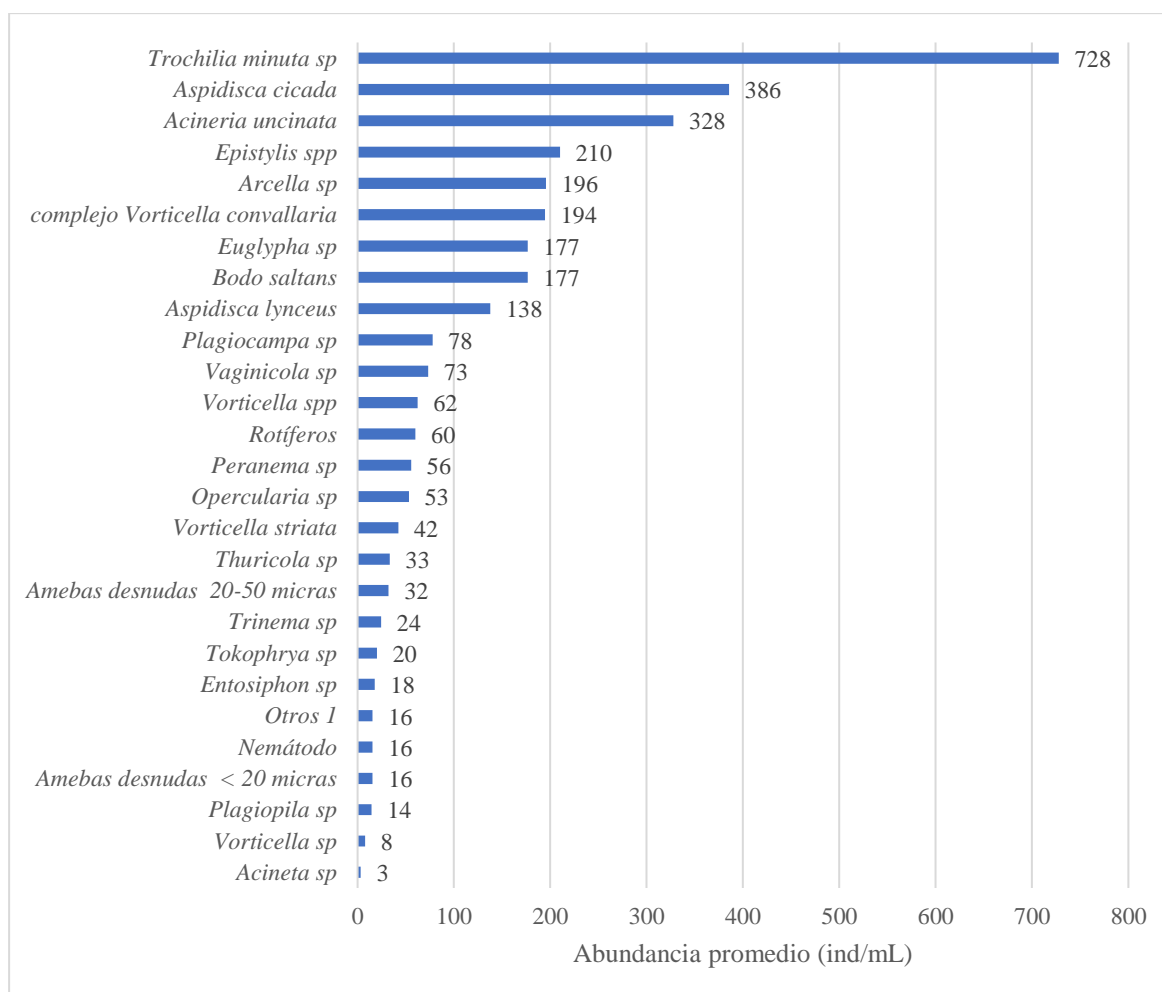


Figura 4.17: Promedio de número de individuos para cada taxón de protistas y micrometazoos identificados en el reactor MBR.

Por último, en cuanto al análisis de la frecuencia relativa de aparición de estos taxones, *Bodo saltans* presentó, como en los otros casos, la frecuencia de aparición más alta. *Acineria uncinata*, al igual que *Euglypha sp*, aparecieron en un porcentaje de muestras muy elevado y similar en los tres compartimentos. El complejo *Vorticella convallaria* presentó una abundancia alta, semejante a la de las cámaras anóxica y aeróbica, esta vez con una frecuencia de aparición algo más elevada. Entre los taxones más relevantes se detectaron también los rotíferos, con una frecuencia de aparición notable, así como *Acineria uncinata* y *Arcella sp*. *Epistylis spp* y *Peranema sp* fueron muy frecuentes en este reactor, aunque *Peranema sp* es más frecuente en el compartimento aeróbico, mientras que *Epistylis spp* presentó una mayor frecuencia de aparición en el reactor MBR. *Plagiocampa sp* cobra más protagonismo, detectándose en más de la mitad de las muestras. *Vorticella spp*, *Trochilia minuta*, *Aspidisca lynceus* y las amebas de 20-50 micras tuvieron una frecuencia de aparición del 50%. Los taxones *Trinema sp*, *Entosiphon sp*,

Thuricola sp, *Vaginicola* sp, *Tokophrya* sp y los nemátodos presentaron una frecuencia más baja, aunque superior a un tercio de los muestreos realizados (Figura 4.18). Los resultados completos se pueden consultar en la Tabla 8.29 del Anexo.

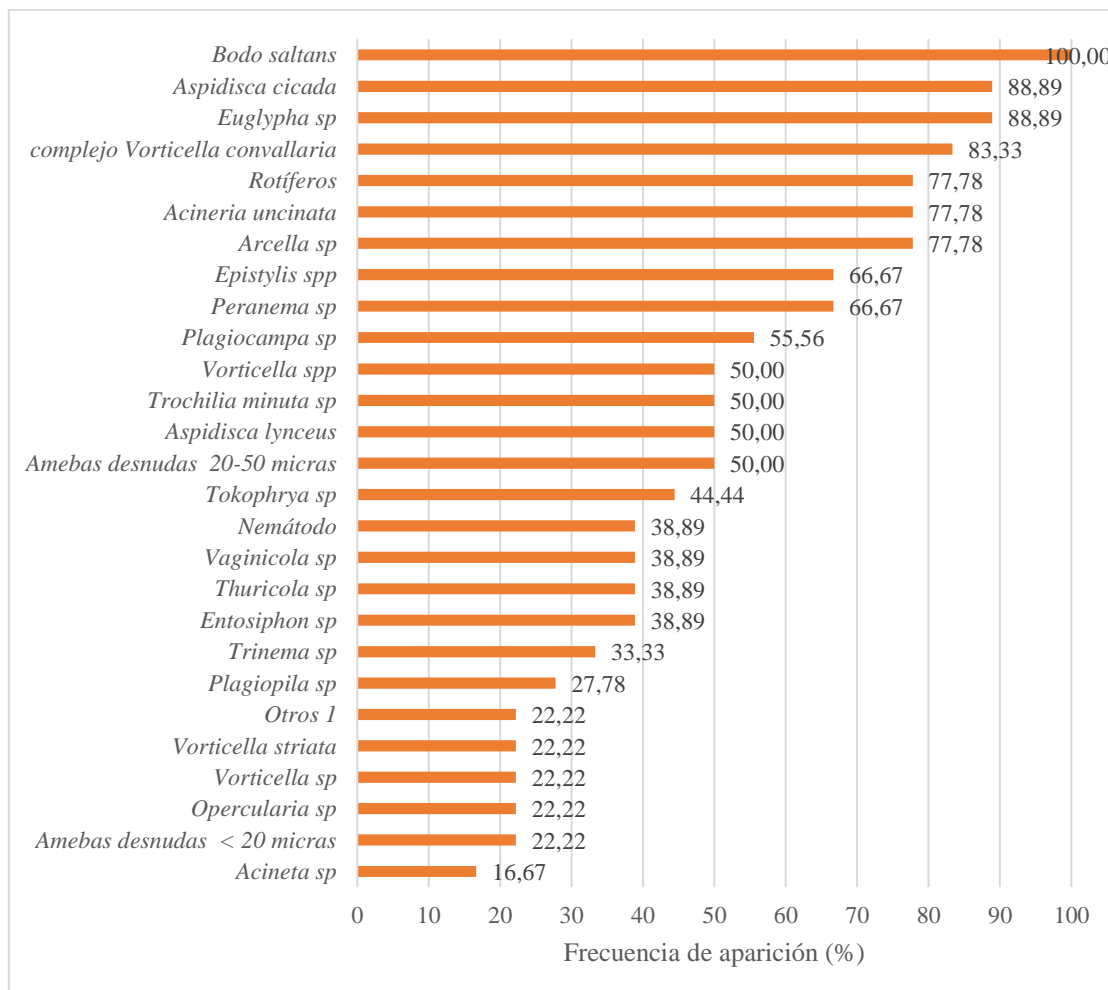


Figura 4.18: Frecuencia relativa de aparición para cada taxón de protistas y micrometazoos identificados en el reactor MBR.

Cuando comparamos los resultados de abundancia y frecuencia de aparición en cada uno de los tres reactores estudiados, se observa que hay especies o grupos que sólo se encuentran o que están ausentes en alguno de ellos. Concretamente *Pseudochilodonopsis* sp sólo se observó en la cámara anóxica. *Acineta* sp no apareció en la cámara aeróbica, *Centropyxis* sp, *Chilodonella* sp, el complejo *Vorticella microstomun* y *Euglena* sp sólo se observaron en esta cámara. *Stentor* sp no aparece en el reactor MBR, y *Vorticella* sp solo se observó en la cámara anóxica y el reactor MBR.

Debemos destacar que el número de especies detectadas fue elevado: 29, 29 y 27 especies para los reactores anóxico, aeróbico y MBR respectivamente, incluyendo tanto las especies comunes como las no comunes.

Para comprender el comportamiento y la evolución de las poblaciones frente a las características abióticas ya estudiadas, se abordaron estudios sobre su estructura, diversidad y la dinámica poblacional, lo cuales nos permitieron obtener una visión global de la comunidad de protistas y micrometazoos de este ecosistema artificial.

4.3.3. Estructura de la comunidad

Una vez conocida la riqueza y la abundancia de la comunidad eucariota en cada uno de los compartimentos del biorreactor se procedió al estudio de su estructura, por una parte, y de sus interacciones con el medio abiótico (parámetros fisicoquímicos y operacionales) por otra.

4.3.3.1. Heterogeneidad, uniformidad y dominancia

Los índices de diversidad alfa se calcularon para cada compartimento del reactor biológico, esta información se encuentra en la Tabla 8.30 del Anexo.

Para conocer la evolución de la diversidad a lo largo del periodo de muestreo para cada reactor y entre ellos, se implementó un análisis ANOVA de dos vías. Este análisis reflejó diferencias significativas entre los muestreos, es decir, a lo largo del tiempo, con un resultado para 17 grados de libertad de $F=2,7981$ y $p=0,0052$, sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los tres compartimentos para un mismo muestreo, habiéndose obtenido un resultado para 2 grados de libertad de: $F=1,7314$ y $p=0,1923$.

También se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, la cual indicó que el índice de Shannon del reactor MBR no seguía una distribución normal ($p<0,05$). La prueba de Kruskal-Wallis demostró que no existían diferencias significativas entre las medianas de los tres reactores, habiéndose obtenido el resultado de: $H(\chi^2): 1,849$; p -valor: $0,3966$.

Para completar el estudio, se realizaron los análisis de similitud de ANOSIM y PERMANOVA, obteniendo, para el primero de ellos, el resultado de: $R=0,0090$ y $p=0,4366$ y

ninguna diferencia por pares de grupos (estaciones); y para el segundo, el resultado de $F=1,764$ y $p=0,127$, sin apreciarse tampoco diferencias entre los grupos. Los dos análisis fueron ejecutados utilizando el índice de similitud de Bray-Curtis.

La riqueza específica en la **cámara anóxica** (Figura 4.19) es mayor al final del periodo de estudio, al igual que su heterogeneidad (H'), mientras que la uniformidad de la comunidad se mantuvo casi constante en este compartimento. Se observan dos episodios en los que la diversidad se altera de manera acusada, en los muestreos tercero y decimoquinto. En ambos casos, la riqueza específica fue mayor, pero la heterogeneidad disminuyó debido a la pérdida de uniformidad, ya que algunos de los taxones presentes mostraron una mayor abundancia, como es el caso de *Trochilia minuta* (véase apartado anterior), dando lugar a una mayor dominancia de éstos respecto de los demás (Figura 4.20). En el tercer muestreo, el cambio de diversidad coincide con el inicio de la recirculación de los fangos procedentes de la cámara aeróbica y que se puso en servicio una vez comenzada la explotación de la instalación, ya que este bombeo de fangos no estaba incluido en el diseño inicial de la instalación. El episodio de pérdida más claro se observa durante los muestreos posteriores a las lluvias registradas durante el muestreo trece, periodo comprendido entre los muestreos 14 a 16, recuperándose en los siguientes.

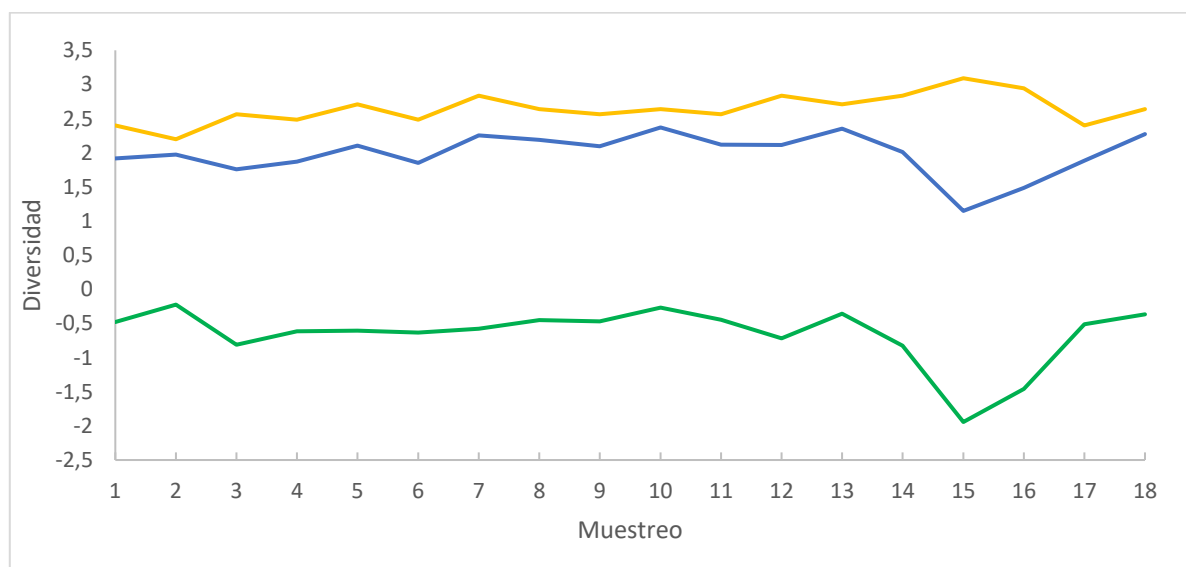


Figura 4.19: Relación de riqueza, heterogeneidad y equidad (SHE) para los datos de los protistas y micrometazoos en la cámara anóxica. En amarillo se muestra la riqueza específica ($\ln S$); en azul la heterogeneidad (índice de Shannon-Wiener, H'); en verde se muestra la uniformidad ($\ln E$).

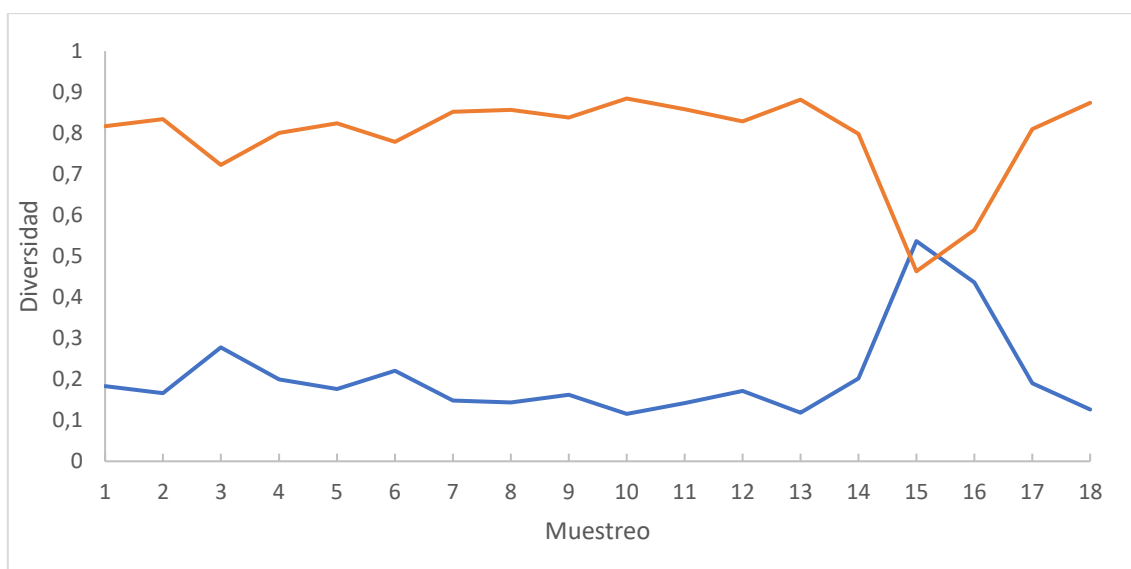


Figura 4.20: Estudio, en la cámara anóxica, de la evolución de la dominancia, en azul; y el índice de diversidad de Simpson, en naranja, para el periodo de muestreo.

En cuanto a la **cámara aeróbica**, (Figura 4.21), el cambio provocado por la avenida de caudal extra a causa de las lluvias fue más acusado y temprano que para la cámara anóxica, ya que se produjo un “lavado” casi total de la microbiota. En este caso, la riqueza y la heterogeneidad disminuyeron bruscamente, si bien la uniformidad se mantuvo estable, es decir, había menos especies, pero la abundancia era similar entre ellas. Es cierto que la diversidad se recuperó en el siguiente muestreo hasta valores que podríamos considerar normales, sin embargo, en el muestreo 15 la heterogeneidad disminuyó al tener lugar una importante pérdida de uniformidad de la comunidad debido al notable aumento en la abundancia de la especie *Trochilia minuta*, dando lugar a un alto valor de dominancia (Figura 4.22), como también se observó en la cámara anóxica. La alta pluviosidad registrada en el muestreo 16 no afectó a la recuperación de la diversidad en este compartimento, que se mantuvo prácticamente constante hasta el final del periodo de muestreo. Al final del periodo de muestreo, los tres índices de diversidad presentaron valores mayores que al inicio, por tanto, podemos considerar que la comunidad evolucionó recuperando su complejidad inicial.

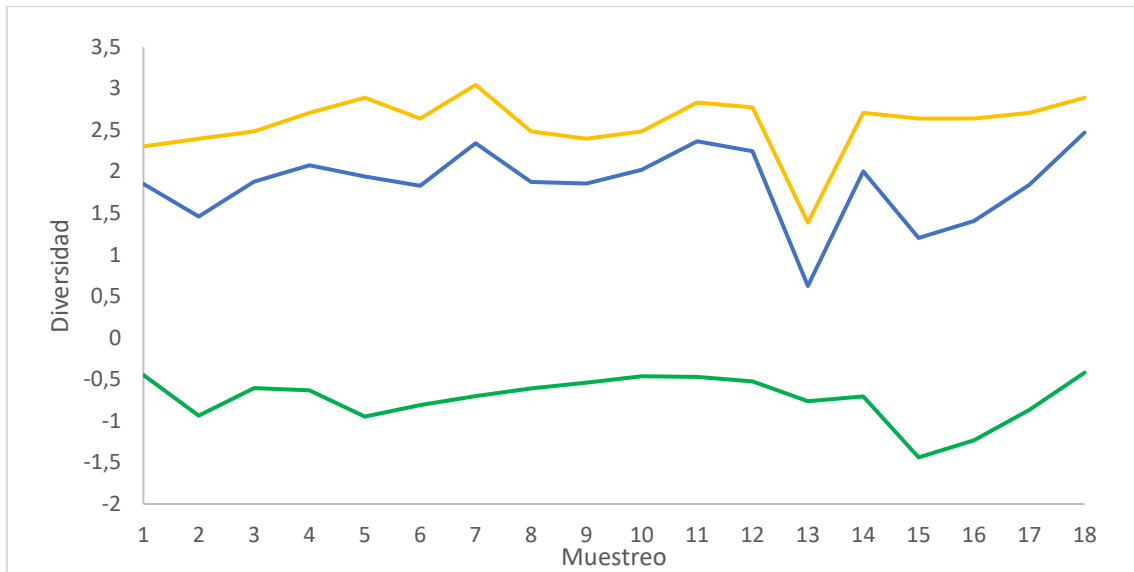


Figura 4.21: Relación de riqueza, heterogeneidad y equidad (SHE) para los datos de los protistas y micrometazoos en la cámara aeróbica. En amarillo se muestra la riqueza específica ($\ln S$); en azul la heterogeneidad (índice de Shannon-Wiener, H'); en verde se muestra la uniformidad ($\ln E$).

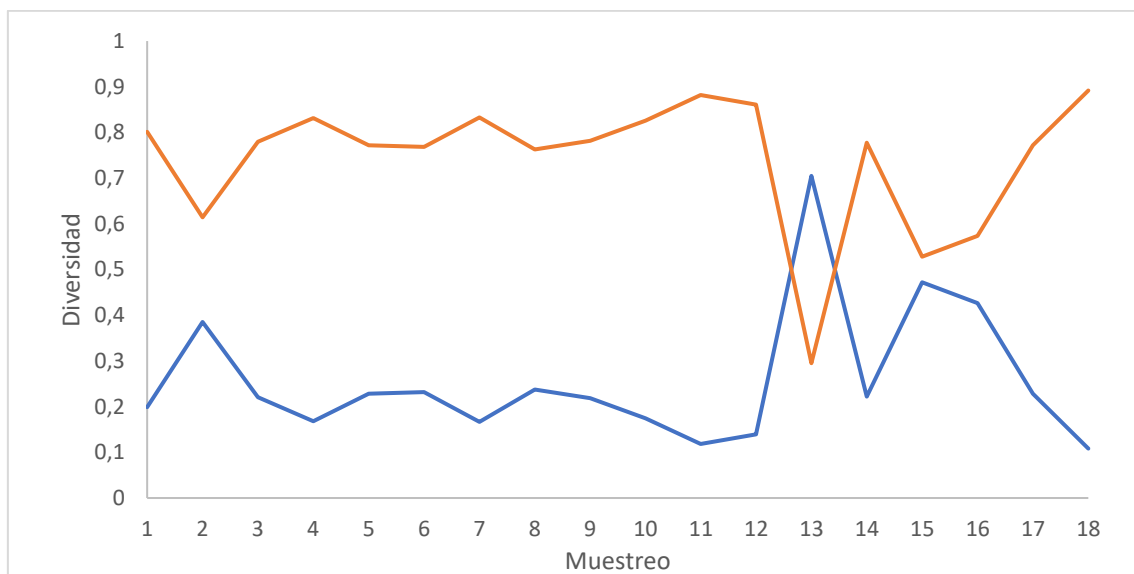


Figura 4.22: Estudio, en la cámara aeróbica, de la evolución de la dominancia, en azul; y el índice de diversidad de Simpson, en naranja, para el periodo de muestreo.

Para el último de los tres reactores que componen el tratamiento biológico de la EDAR, el **MBR**, la diversidad presentó mayores fluctuaciones que en los otros compartimentos (Figura 4.23).

El primer cambio importante en los valores de diversidad se observó en el muestreo 6, en el cual se obtuvo una menor riqueza específica y descenso del índice de Shannon, aunque manteniendo la uniformidad, coincidiendo con valores de decantabilidad más bajos. Como en este reactor se produce una concentración del fango activo por el permeado del agua depurada, los efectos que pudiera provocar el influente son menores o tardan más en detectarse. Este es el caso del episodio de lluvias ocurrido durante las fechas correspondientes al muestreo 13 y reflejados en los anteriores compartimentos del reactor, los cambios en la composición de la comunidad se apreciaron con posterioridad, en el muestreo 15, donde hubo un aumento en el número de especies y la comunidad se desequilibró, aumentando la dominancia *Trochilia minuta* (Figura 4.24); a partir del muestreo 16, la diversidad se equilibró y se recuperaron valores habituales para el reactor. Hay que destacar que, en la muestra del mes 17, se observó una menor cantidad de agua en el reactor acompañado de espumas, lo que podría explicar la menor riqueza en el reactor, que se restableció posteriormente.

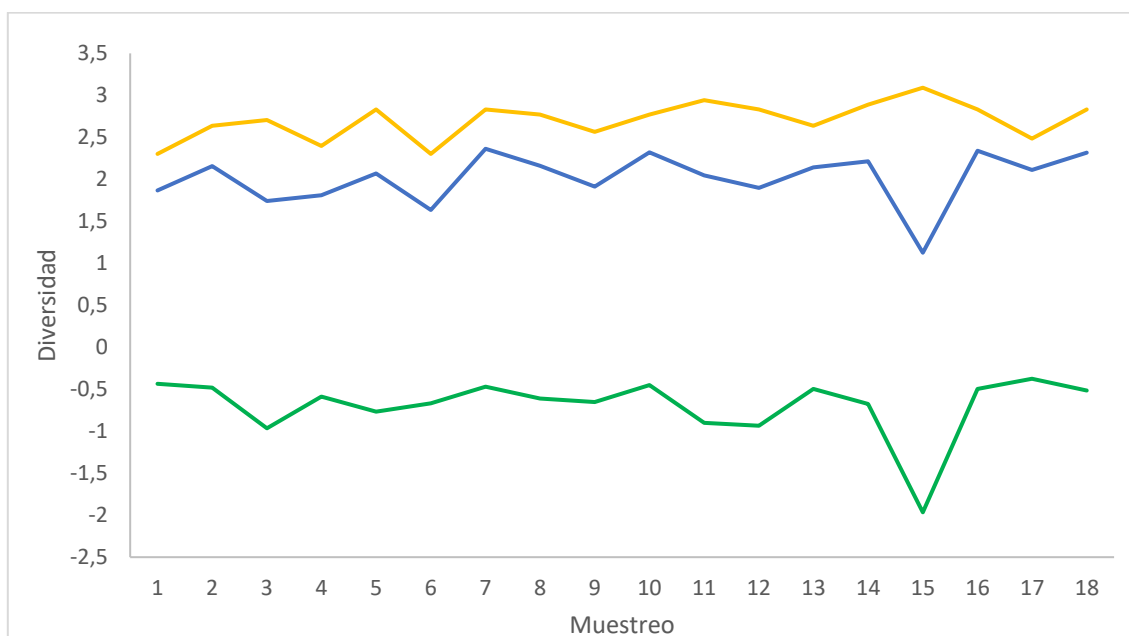


Figura 4.23: Relación de riqueza, heterogeneidad y equidad (SHE) para los datos de los protistas y micrometazoos en el reactor MBR. En amarillo se muestra la riqueza específica ($\ln S$); en azul la heterogeneidad (índice de Shannon-Wiener, H'); en verde se muestra la uniformidad ($\ln E$).

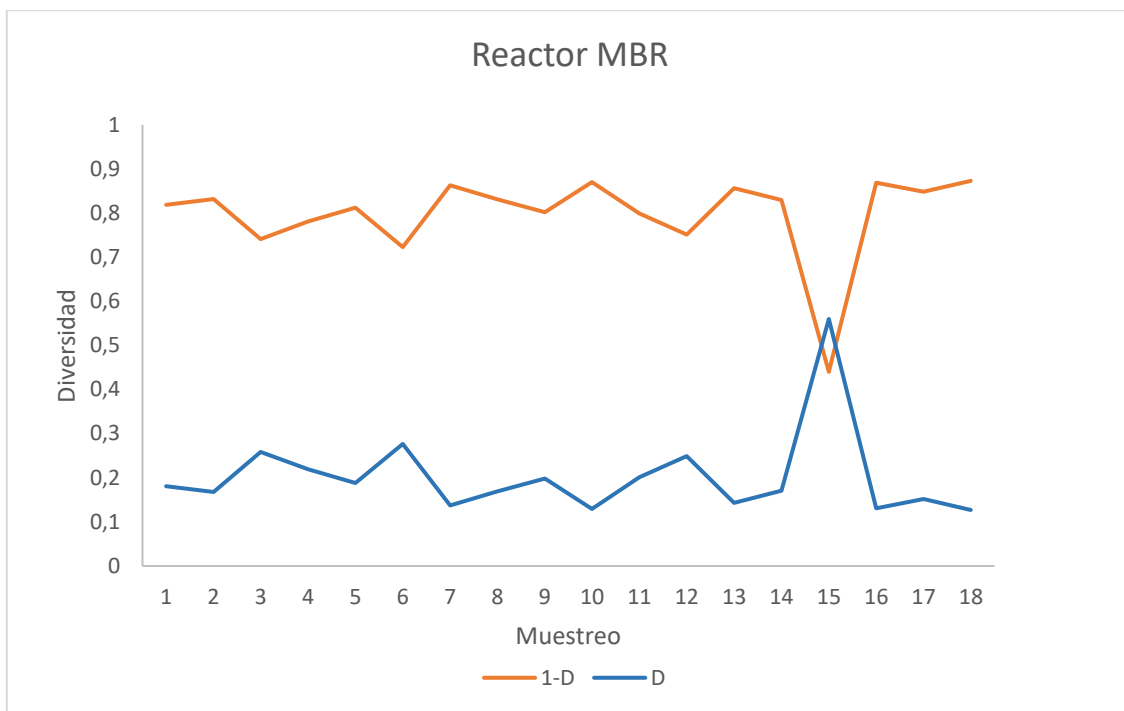


Figura 4.24: Estudio, en el reactor MBR, de la evolución de la dominancia, en azul; y el índice de diversidad de Simpson, en naranja, para el periodo de muestreo.

Relación entre el Índice de Shannon y las variables fisicoquímicas y operacionales

Una vez conocida la evolución de la diversidad a lo largo del periodo de estudio, se analizó su comportamiento frente a las variables ambientales. Para ello, se llevó a cabo la representación gráfica de la relación entre índice de diversidad de Shannon y las diferentes variables ambientales analizadas de cada grupo de variables fisicoquímicas establecidas.

Para las variables fisicoquímicas analizadas en el **influyente** encontramos que, respecto al pH, la diversidad no se vio afectada en la cámara anóxica y el reactor MBR, pero sí en la cámara aeróbica, para la cual, valores de pH superiores a 7,8 Ud provocaron un descenso de la diversidad (Figura 4.25). La turbidez por encima de 400 UNF (Figura 4.25) tuvo una influencia positiva en el Índice de Shannon en los tres compartimentos. Una conductividad superior a 1.000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ provocó un descenso de la diversidad en la cámara anóxica y el reactor MBR, pero no en la cámara aeróbica, en el que se mantuvo constante (Figura 4.25).

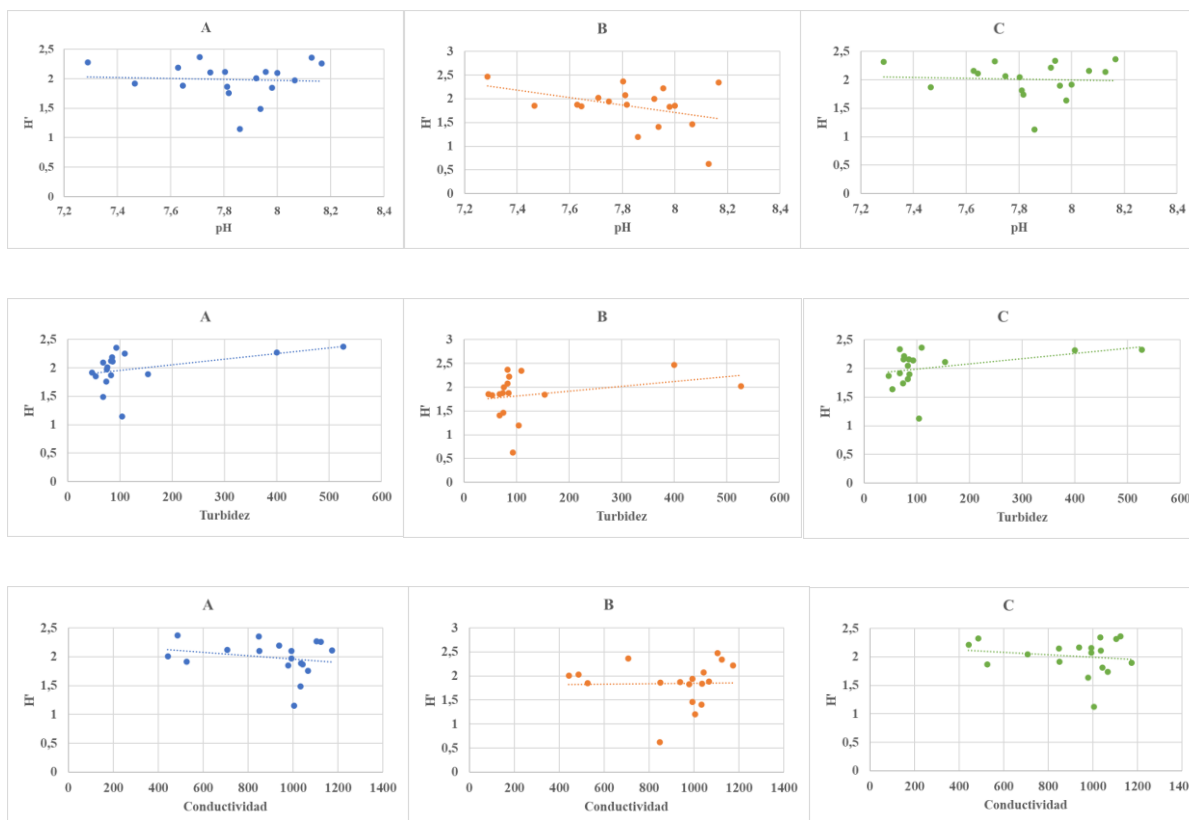
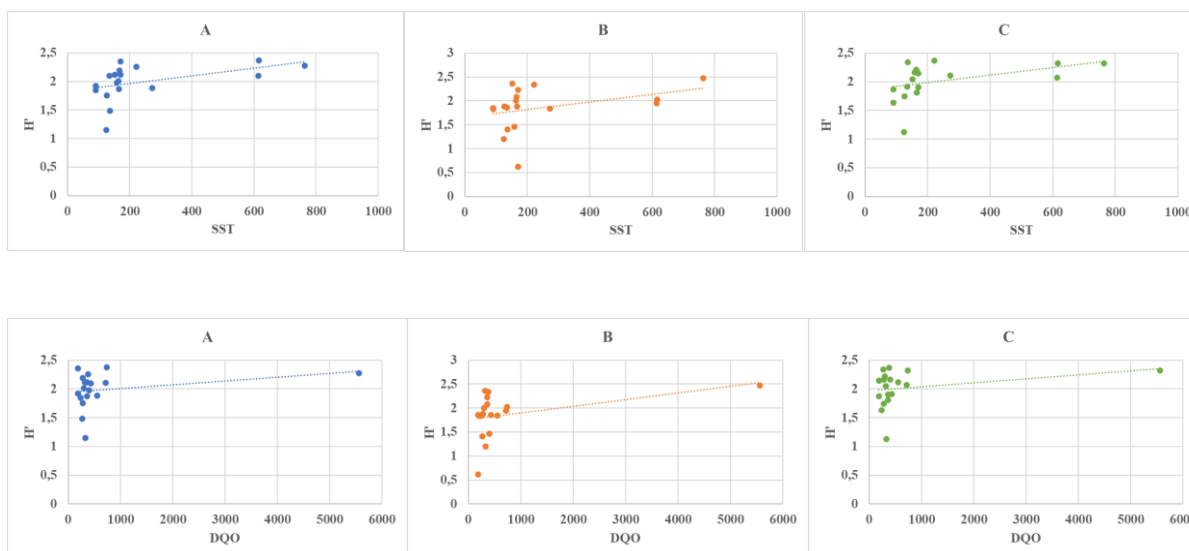


Figura 4.25: Correlación de valores de diversidad alfa calculada como Índice de Shannon en los tres compartimentos, A: Cámara anóxica; B: Cámara aeróbica; C: Reactor MBR; con los parámetros fisicoquímicos analizados en el influente. Cada parámetro queda identificado en el título del eje horizontal de cada gráfico de dispersión. La línea discontinua muestra la tendencia.

Los SST, la DQO y la DBO₅ (Figura 4.26) tuvieron el mismo efecto en los tres compartimentos, a mayores valores de concentración de estos parámetros, mayor es la diversidad observada.



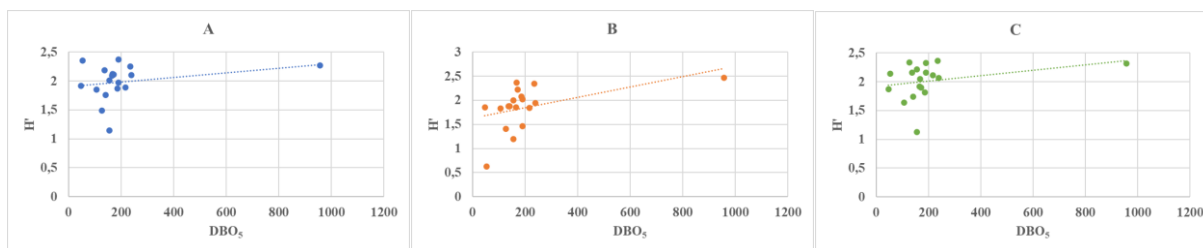


Figura 4.26: Correlación de valores de diversidad alfa calculada como índice de Shannon en los tres compartimentos, A: Cámara anóxica; B: Cámara aeróbica; C: Reactor MBR; con los parámetros fisicoquímicos analizados en el influente. Cada parámetro queda identificado en el título del eje horizontal de cada gráfico de dispersión. La línea discontinua muestra la tendencia.

No se observaron cambios en la diversidad para todo el rango de concentraciones de $N-NH_4^+$ (Figura 4.27) en la cámara anóxica, pero, sin embargo, en la cámara aeróbica y el reactor MBR, concentraciones por encima de los 50 mg/L sí provocaron un aumento de la diversidad.

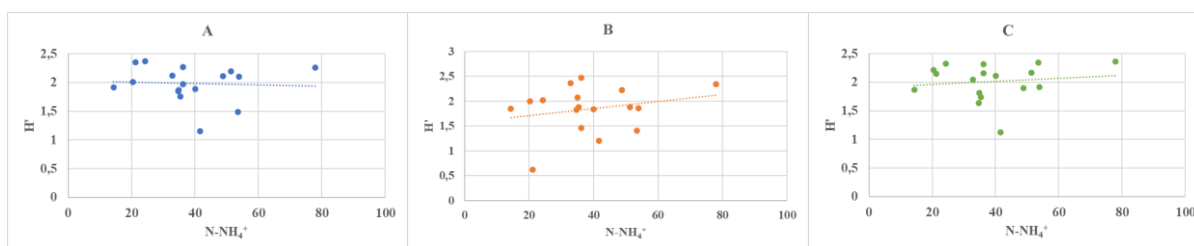


Figura 4.27: Correlación de valores de diversidad alfa calculada como Índice de Shannon en los tres compartimentos, A: Cámara anóxica; B: Cámara aeróbica; C: Reactor MBR; con el nitrógeno de amonio ($N-NH_4^+$) analizado en el influente. La línea discontinua muestra la tendencia.

En cuanto a $N-NO_2^-$ (Figura 4.28), su rango de variación es muy pequeño en los compartimentos anóxico y MBR (0-0,6 mg/L), pero concentraciones superiores a 0,2 mg/L en la cámara aeróbica podrían dar lugar a una disminución de la diversidad alfa. El mismo comportamiento que con los $N-NO_2^-$ se observó con $N-NO_3^-$ y TON (Figura 4.28), en este caso, en la cámara aeróbica inducirían un descenso de la diversidad a concentraciones superiores a 2,5 mg/L y 3 mg/L respectivamente.

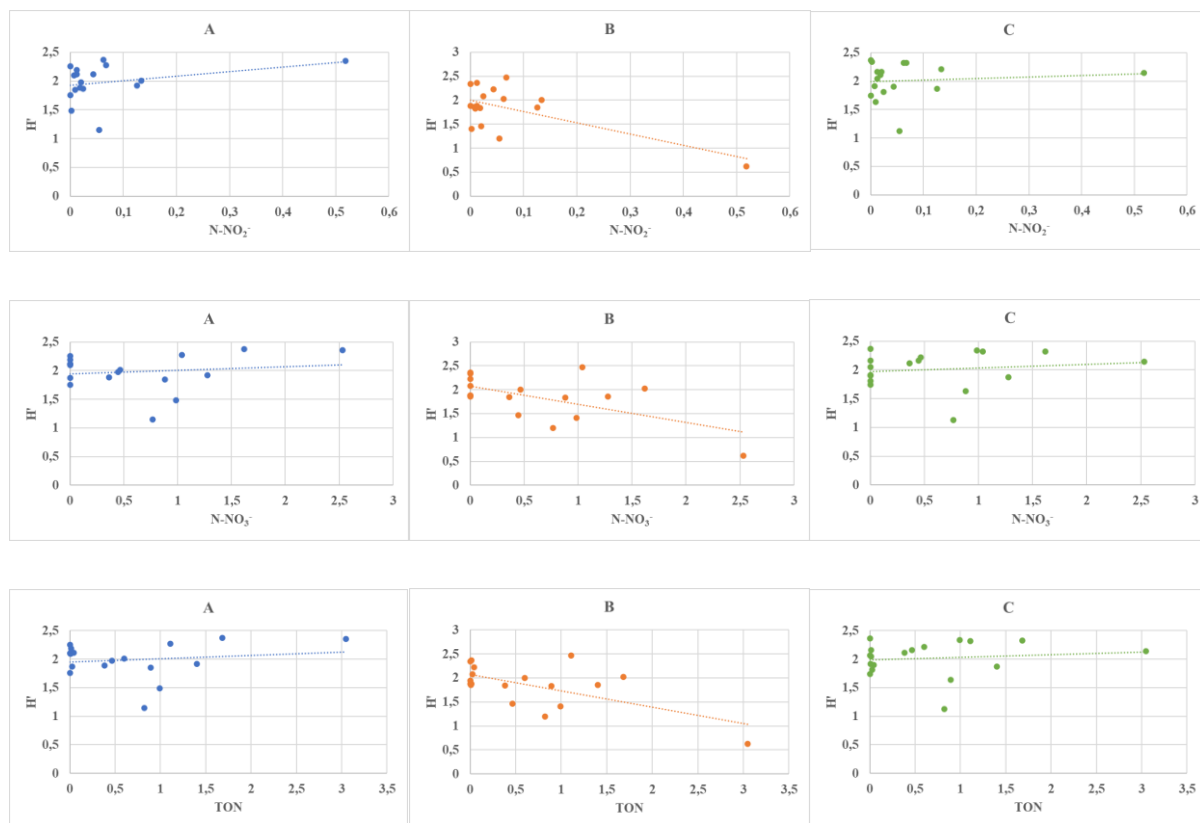
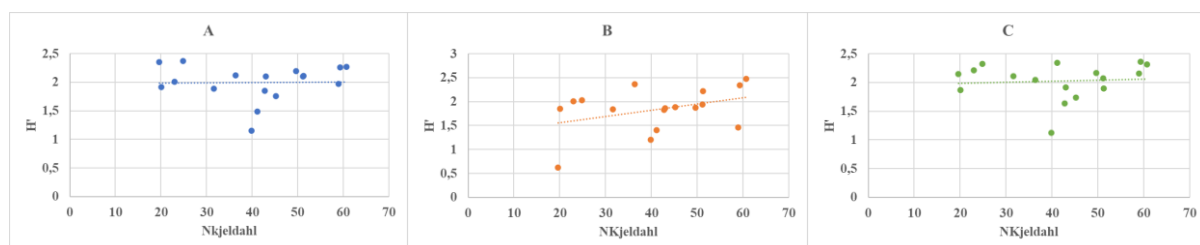


Figura 4.28: Correlación de valores de diversidad alfa calculada como índice de Shannon en los tres compartimentos, A: Cámara anóxica; B: Cámara aeróbica; C: Reactor MBR; con los parámetros fisicoquímicos analizados en el influente. Cada parámetro queda identificado en el título del eje horizontal de cada gráfico de dispersión. La línea discontinua muestra la tendencia.

Sin embargo, en el caso del NKjeldahl y el NT (Figura 4.29), que nuevamente no influyen sobre la diversidad alfa de la cámara anóxica ni sobre la del reactor MBR, sí influyeron positivamente en la diversidad de la cámara aeróbica, observándose, en ambos casos, un aumento de la diversidad a concentraciones superiores a los 40 mg/L.



Capítulo 4

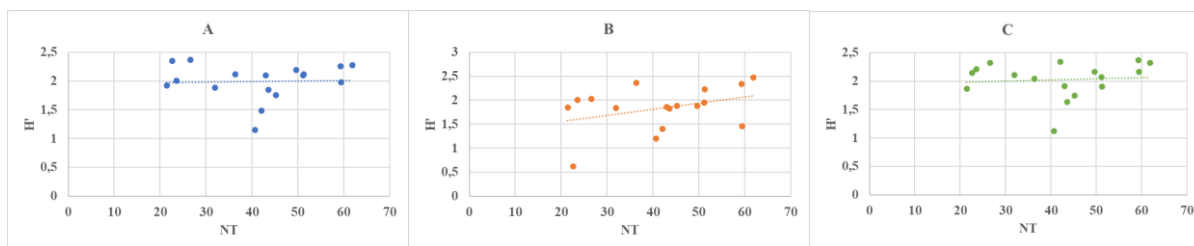


Figura 4.29: Correlación de valores de diversidad alfa calculada como índice de Shannon en los tres compartimentos, A: Cámara anóxica; B: Cámara aeróbica; C: Reactor MBR; con los parámetros fisicoquímicos analizados en el influente. Cada parámetro queda identificado en el título del eje horizontal de cada gráfico de dispersión. La línea discontinua muestra la tendencia.

Cuando se considera la relación del PT con la diversidad el resultado es muy diferente (Figura 4.30), este factor sí afectó positivamente a la diversidad alfa de los tres compartimentos, para los cuales, la presencia de fósforo en concentraciones superiores a 15 mg/L trajo asociada una mayor diversidad alfa.

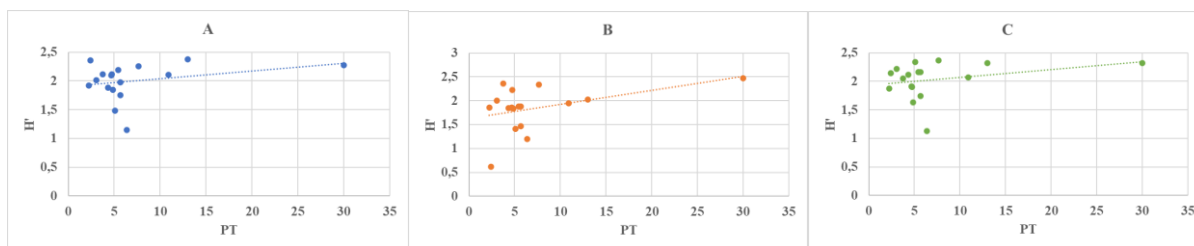


Figura 4.30: Correlación de valores de diversidad alfa calculada como Índice de Shannon en los tres compartimentos, A: Cámara anóxica; B: Cámara aeróbica; C: Reactor MBR; con el fósforo total (PT) analizado en el influente. La línea discontinua muestra la tendencia.

Respecto al **efluente**, se presentan los resultados siguiendo el mismo orden en la comparación de las variables que se caracterizaron en el influente. La primera variable, el pH (Figura 4.31), no tuvo influencia sobre la diversidad alfa del reactor MBR, que se mantuvo en todo el rango de pH, mientras que, en la cámara anóxica, la diversidad se vio favorecida para valores de pH superiores a 7,7 Ud, al contrario de lo observado en la cámara aeróbica, que, para el mismo valor de pH, la diversidad fue afectada negativamente.

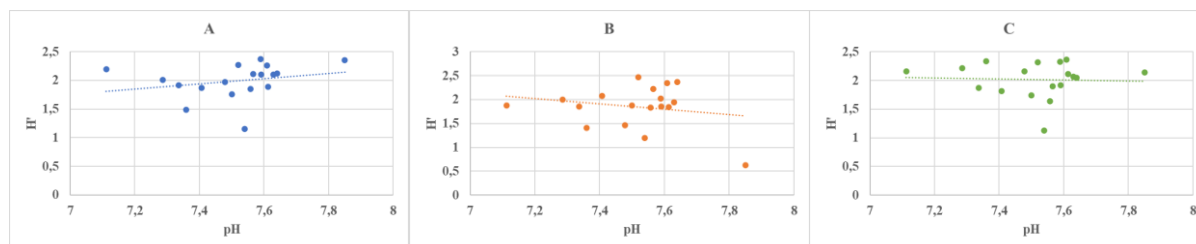
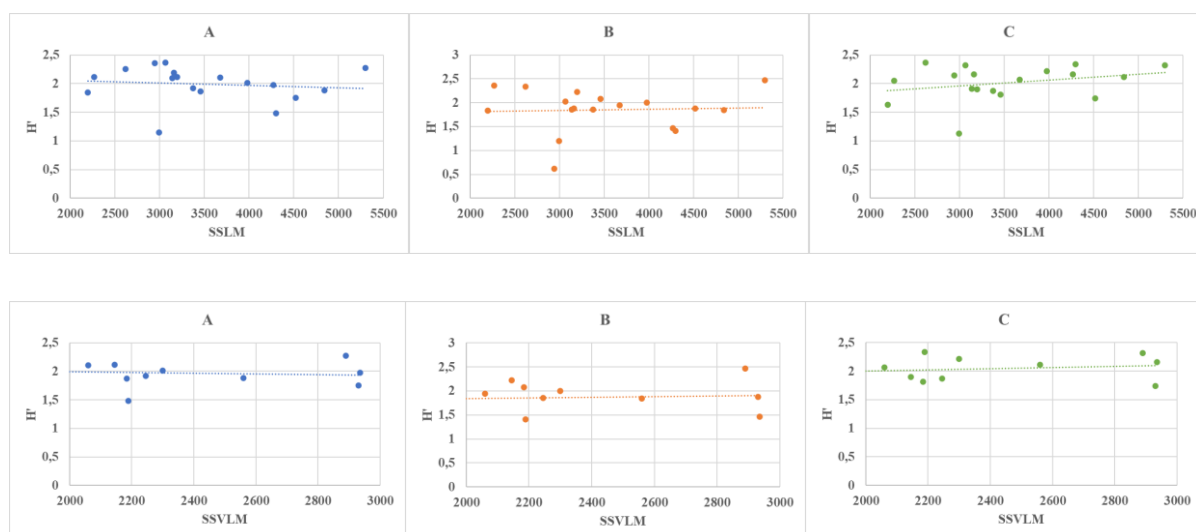


Figura 4.31: Correlación de valores de diversidad alfa calculada como Índice de Shannon en los tres compartimentos, A: Cámara anóxica; B: Cámara aeróbica; C: Reactor MBR; con el pH analizado del efluente. La línea discontinua muestra la tendencia.

La turbidez y conductividad no tuvieron efecto sobre la diversidad, al igual que los SST, DQO, DBO₅, N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻, TON, NKjeldahl, NT y PT. Las figuras de dispersión de estas variables no se muestran por no aportar información relevante.

En lo relativo a las **variables operacionales de control de proceso** y su capacidad moduladora de la diversidad alfa en los diferentes compartimentos del biorreactor, se obtuvieron los resultados que se explican a continuación.

Para los tres compartimentos estudiados, los parámetros SSLM y SSVLM (Figura 4.32) no mostraron incidencia sobre la diversidad alfa en las cámaras anóxica ni aeróbica, al igual que los SSVLM en el reactor MBR, únicamente se detectó una leve influencia positiva sobre el Índice de Shannon, modulada por los SSLM, para los cuales, se observaron índices de diversidad más elevados a concentraciones superiores a 4.000 mg/L en el reactor MBR.



Capítulo 4

Figura 4.32: Correlación de valores de diversidad alfa calculada como Índice de Shannon en los tres compartimentos, A: Cámara anóxica; B: Cámara aeróbica; C: Reactor MBR; con los parámetros SSLM y SSVLM. Cada parámetro queda identificado en el título del eje horizontal de cada gráfico de dispersión. La línea discontinua muestra la tendencia.

Para el parámetro V30 (Figura 4.33), se observa un ligero descenso de la diversidad en los compartimentos anóxico y aeróbico, cuando éste presenta valores superiores a 700 mL. Respecto al reactor MBR no se advirtió influencia alguna sobre la diversidad.

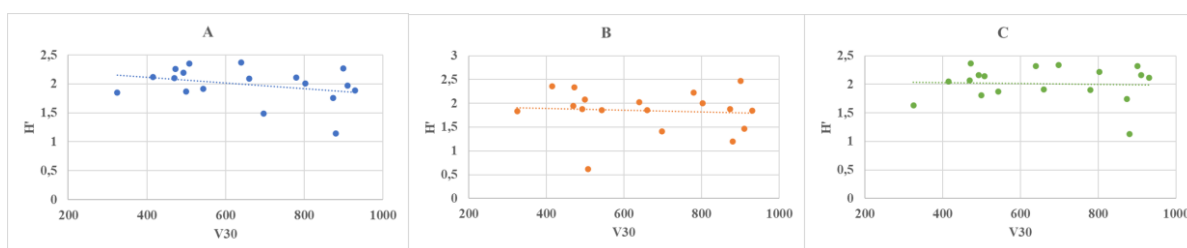


Figura 4.33: Correlación de valores de diversidad alfa calculada como Índice de Shannon en los tres compartimentos, A: Cámara anóxica; B: Cámara aeróbica; C: Reactor MBR; respecto a la V30. La línea discontinua muestra la tendencia.

El pH (Figura 4.34) no afectó a la diversidad en la cámara anóxica ni en el MBR, pero sí afectó de manera clara a la diversidad en la cámara aeróbica, en el que valores superiores a 6,70 Ud dieron lugar a una reducción importante en la misma.

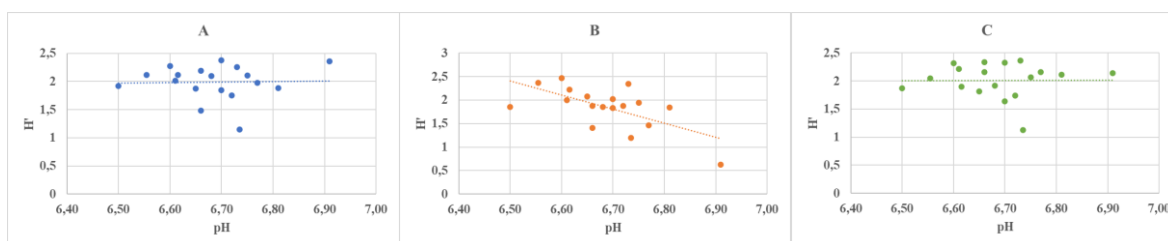


Figura 4.34: Correlación de valores de diversidad alfa calculada como Índice de Shannon en los tres compartimentos, A: Cámara anóxica; B: Cámara aeróbica; C: Reactor MBR; respecto al pH. La línea discontinua muestra la tendencia.

La temperatura y el TRH (Figura 4.35) no parecieron tener influencia sobre la diversidad de los protistas de los reactores anóxico y MBR, mientras que, para la cámara aeróbica, temperaturas entre 12°C y 22°C indujeron una mayor diversidad y, de manera análoga, el Índice de Shannon en este compartimento se vio favorecido por TRH entre 50 y 70 horas, observándose una menor diversidad si este parámetro era inferior a 40 horas.

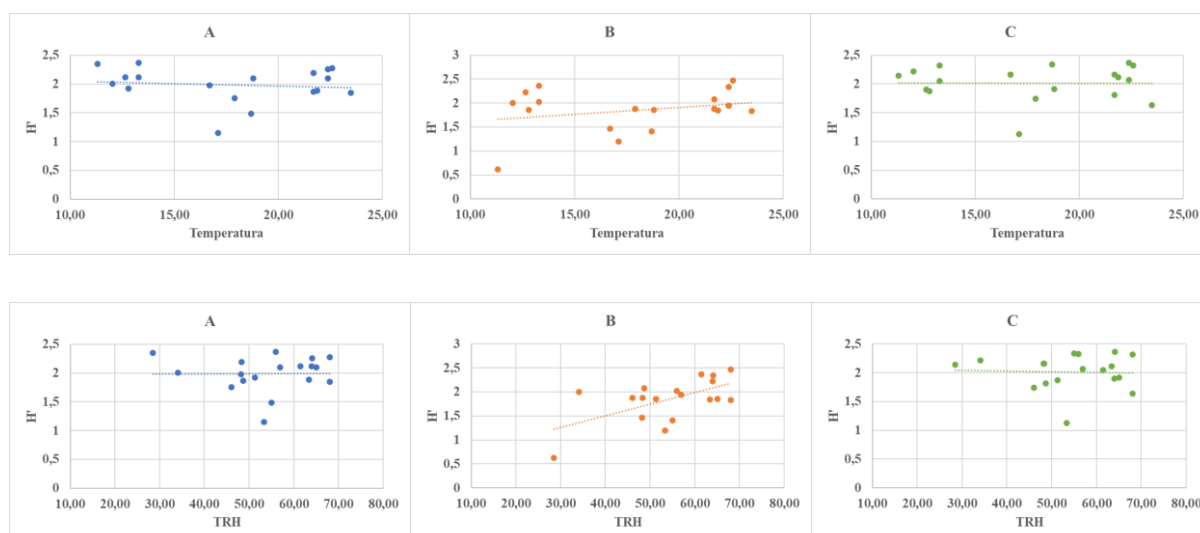


Figura 4.35: Correlación de valores de diversidad alfa calculada como Índice de Shannon en los tres compartimentos, A: Cámara anóxica; B: Cámara aeróbica; C: Reactor MBR; con los parámetros temperatura y TRH. Cada parámetro queda identificado en el título del eje horizontal de cada gráfico de dispersión. La línea discontinua muestra la tendencia.

El último parámetro analizado fue el TRC (Figura 4.36), y los datos indicaron que tiempos superiores a los 70 días, disminuían levemente los valores de diversidad calculados en los tres compartimentos del biorreactor.

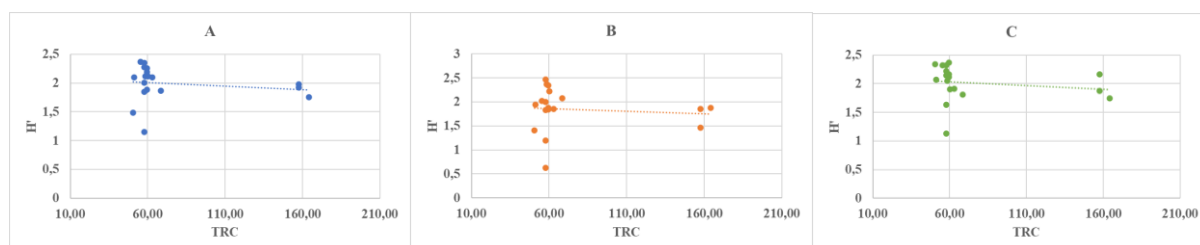


Figura 4.36: Correlación de valores de diversidad alfa calculada como Índice de Shannon en los tres compartimentos, A: Cámara anóxica; B: Cámara aeróbica; C: Reactor MBR; respecto al TRC. La línea discontinua muestra la tendencia.

Para abordar la influencia o el efecto que pudiera provocar la concentración de los parámetros de control en los compartimentos, se ha analizado cada uno de ellos en un apartado diferente. Recordemos que las variables fisicoquímicas medidas en los compartimentos fueron, además de las de control de proceso, las relacionadas con el nitrógeno y el fósforo.

En cuanto a estos parámetros, analizados en la **cámara anóxica**, únicamente el $N-NH_4^+$ y PT (Figura 4.37) influyeron sobre la diversidad alfa de este compartimento y ambas,

negativamente. Con relación al N-NH_4^+ , éste provocó un descenso en el valor del índice de Shannon en concentraciones superiores a los 10 mg/L; el PT hizo lo propio cuando se encontró en concentraciones superiores a 65 mg/L.

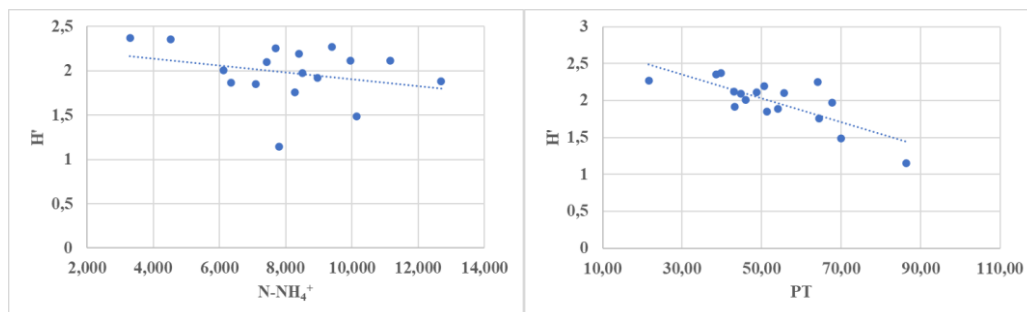


Figura 4.37: Correlación de valores de diversidad alfa calculada como índice de Shannon en la cámara anóxica con los parámetros fisicoquímicos operacionales. Cada parámetro queda identificado en el título del eje horizontal de cada gráfico de dispersión. La línea discontinua muestra la tendencia.

Para el resto de los parámetros analizados no se observó una variación clara en la diversidad alfa.

En el caso de la **cámara aeróbica**, fueron también dos parámetros los que afectaron a la diversidad alfa del reactor, pero a diferencia de lo que ocurrió en la cámara anóxica, concentraciones más altas de estos parámetros tuvieron una influencia positiva sobre la diversidad, más concretamente, a concentraciones de Kjeldahl y de NT superiores a 70 mg/L se detectó una mayor diversidad (Figura 4.38).

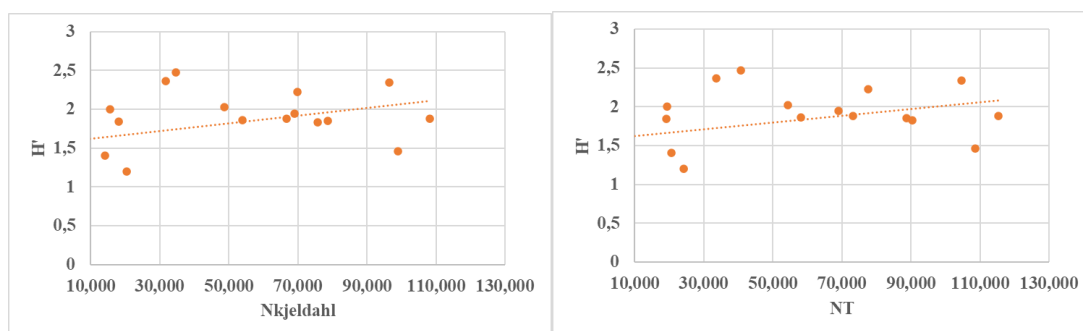


Figura 4.38: Correlación de valores de diversidad alfa calculada como índice de Shannon en la cámara aeróbica; con los parámetros fisicoquímicos operacionales. Cada parámetro queda identificado en el título del eje horizontal de cada gráfico de dispersión. La línea discontinua muestra la tendencia.

El análisis de los demás parámetros no permitió distinguir una influencia clara sobre la diversidad alfa.

El **reactor MBR**, al ser el último de la línea de agua, presentó una mayor estabilidad y ningún parámetro de los estudiados pudo ser identificado como modulador de la diversidad alfa.

4.3.4. Dinámica de las comunidades eucariotas

Para el análisis de la dinámica de la comunidad de protistas y micrometazoos, se utilizaron las abundancias de aquellos taxones cuya frecuencia de aparición y abundancia relativa fueron superiores al 15% y al 0,3% respectivamente, lo que supuso un total de 27 especies en las cámaras anóxica y aeróbica y 25 especies en el reactor MBR. Todos los resultados pueden consultarse en las Tabla 8.31 a 8.33 del Anexo.

4.3.4.1. Análisis de similitudes

Con el fin de conocer la similitud y significación de las especies identificadas en los compartimentos, se realizaron los análisis de disimilitud SIMPER y el análisis IndVal, que identifica aquellas especies más significativas dentro de un determinado grupo, que en nuestro caso fueron las estaciones del año. Además, se realizaron los análisis de ANOSIM y PERMANOVA para cada reactor. Todos estos análisis se realizaron con las matrices de abundancias absolutas (ind/mL) de todos los taxones presentes, ya que las propias pruebas consideran la abundancia o rareza de cada taxón y no es preciso hacer el cribado previo.

Para favorecer la comprensión de los resultados de ambos análisis, se abordaron primero los resultados de SIMPER en los tres reactores y posteriormente en los análisis de valor indicador (IndVal en PAST) para poder así comparar los compartimentos y tener una visión completa y de conjunto de los protistas y micrometazoos presentes en la EDAR.

Contribución de los taxones de protistas y micrometazoos a las diferencias estacionales en la comunidad eucariota

En la **cámara anóxica**, el promedio de disimilitud observado es del 71,68%. En la Tabla 4.17 se muestran las especies que contribuyen más a la disimilitud, aquellas responsables de una disimilitud acumulada del 75%, apareciendo éstos en orden descendente de la especie que más contribuye a la que menos en las diferencias entre grupos. Las especies que más contribuyen son *Trochilia minuta* y *Epistylis spp*, que son las más abundantes en primavera. La contribución de *Arcella sp* es superior al 10% siendo más abundante en verano, mientras que las especies que menos contribuirían son *Bodo saltans* más abundante en otoño, *Aspidisca lynceus*, *Vorticella striata* más abundantes en invierno y *Thuricola sp* con mayores abundancias en verano.

Taxón	Md	Contrib %	Acumulado %	Media Primavera	Media Verano	Media Otoño	Media Invierno
<i>Trochilia minuta</i>	12,71	17,74	17,74	2,09E+03	140	5	127
<i>Epistylis spp</i>	7,903	11,03	28,76	474	15	140	313
<i>Arcella sp</i>	7,579	10,57	39,33	217	650	220	20
<i>Acineria uncinata</i>	6,158	8,591	47,92	443	335	220	233
<i>Euglypha sp</i>	5,937	8,282	56,21	283	490	35	46,7
<i>Aspidisca cicada</i>	5,668	7,907	64,11	200	285	205	413
<i>Bodo saltans</i>	3,18	4,436	68,55	134	160	195	167
<i>Aspidisca lynceus</i>	2,654	3,703	72,25	100	0	15	213
<i>Vorticella striata</i>	1,653	2,306	74,56	14,3	0	0	180
<i>Thuricola sp</i>	1,517	2,116	76,68	37,1	100	20	13,3

Tabla 4.17: Resultados del análisis SIMPER. Contribución de especies a la disimilitud entre las estaciones en la cámara anóxica. Md: media de disimilitud, Contrib: porcentaje de contribución de cada taxón a la disimilitud en el compartimento.

La similitud entre muestreos se realizó con las pruebas ANOSIM y PERMANOVA. El resultado del primero no muestra diferencias significativas entre los grupos a nivel global, ya que se obtuvo un valor de $p=0,3986$ y un valor de $R=0,0256$, pero sí se determina en el análisis por pares, una diferencia significativa entre las muestras de verano-otoño, con un nivel de significación $p=0,03297$ y un $R=0,5313$. Sin embargo, en la prueba PERMANOVA sí se obtienen diferencias entre los grupos, el resultado fue de $F=1,813$ y $p=0,0057$. La comparación por pares corroboró esa diferencia significativa entre las muestras de verano y otoño ($p=0,028$ y $F=2,556$) que ya se observó en ANOSIM, además se observaron diferencias significativas entre las muestras de verano e invierno ($p=0,0301$ y $F=2,985$), así como entre la primavera y el otoño ($p=0,0164$ y $F=2,002$).

La disimilitud promedio que encontramos en la **cámara aeróbica** es del 75,76%, muy similar a la de la cámara anóxica. En la Tabla 4.18 se muestran aquellas especies que más contribuyeron a la disimilitud. Como el caso anterior, solo se muestran las especies hasta alcanzar una disimilitud acumulada del 75%.

Taxón	Md	Contrib. %	Acumulado %	Media Primavera	Media Verano	Media Otoño	Media Invierno
<i>Trochilia minuta</i>	11,31	14,94	14,94	1,57E+03	150	15	46,7
<i>Acineria uncinata</i>	8,754	11,56	26,49	554	675	115	207
<i>Arcella sp</i>	8,604	11,36	37,85	194	760	190	13,3
<i>Aspidisca cicada</i>	7,581	10,01	47,85	314	510	335	227
<i>Epistylis spp</i>	5,6	7,392	55,25	311	5	5	86,7
<i>Euglypha sp</i>	5,463	7,212	62,46	186	470	30	0
<i>Bodo saltans</i>	3,784	4,995	67,45	85,7	95	250	227
<i>Aspidisca lynceus</i>	3,643	4,808	72,26	14,3	155	10	353
<i>Rotíferos</i>	1,843	2,433	74,69	82,9	115	20	13,3
complejo <i>Vorticella convallaria</i>	1,734	2,289	76,98	109	35	10	40

Tabla 4.18: Resultados de SIMPER. Contribución de especies a la disimilitud entre las estaciones en la cámara aeróbica. Md: media de disimilitud, Contrib: porcentaje de contribución de cada taxón a la disimilitud en el compartimento.

Excepto las dos últimas especies, las demás coincidieron con los resultados de la cámara anóxica, siendo nuevamente *Trochilia minuta* la que más contribuyó a la disimilitud, seguida por *Acineria uncinata* y *Arcella sp*, con una contribución moderada. Cabe destacar que, entre las especies referidas, se señalan los rotíferos, que son un grupo de micrometazoos, aunque su contribución es baja.

El resultado del análisis ANOSIM a nivel global no mostró diferencias significativas entre los grupos, por lo que se pueden considerar similares entre ellos, con una significación de $p=0,1289$ y $R=0,128$. El análisis por pares sí que identificó diferencias significativas entre dos pares de grupos, verano y otoño, con un $p=0,0280$ y $R=0,6875$ y verano e invierno con un $p=0,0230$ y $R=0,537$, en ambos casos, puede considerarse que las muestras son diferentes entre esos pares de grupos. El resultado del análisis PERMANOVA apoyó este resultado con un $F=1,95$ y $p=0,0025$, identificando diferencias significativas entre los pares de muestreos de verano y otoño ($p=0,0307$ y $F=3,57$), verano e invierno ($p=0,0294$ y $F=2,628$) y entre los grupos primavera y otoño ($p=0,0103$ y $F=2,167$).

Por último, en el **reactor MBR** nos encontramos un promedio de disimilitud del 73,19%, resultado intermedio entre los otros dos reactores. Para este reactor, la disimilitud es más baja en los primeros taxones de la lista, por lo que para alcanzar la disimilitud acumulada del 75% que se ha establecido como criterio de corte, es preciso tener en cuenta más especies (Tabla 4.19).

Nuevamente la especie más representativa fue *Trochilia minuta*, en esta ocasión con una menor contribución, seguida de *Aspidisca cicada* y *Acineria uncinata* con una contribución moderada. La contribución de *Epistylis spp* y *Arcella sp* es también considerable, esta última representa menor disimilitud que en los otros dos reactores, mientras que la de *Euglypha sp*, complejo *Vorticella convallaria* y *Aspidisca lynceus* es intermedia. El resto de los taxones contribuyeron poco a la disimilitud.

Taxón	Md	Contrib. %	Acumulado %	Media Primavera	Media Verano	Media Otoño	Media Invierno
<i>Trochilia minuta</i>	9,312	12,72	12,72	1,73E+03	135	10	127
<i>Aspidisca cicada</i>	7,198	9,835	22,56	334	225	590	447
<i>Acineria uncinata</i>	6,132	8,379	30,94	449	210	210	360
<i>Epistylis spp</i>	5,312	7,257	38,19	443	115	25	40
<i>Arcella sp</i>	5,236	7,154	45,35	140	390	200	60
<i>Euglypha sp</i>	4,929	6,734	52,08	234	335	25	33,3
complejo <i>Vorticella convallaria</i>	4,633	6,33	58,41	103	40	155	667
<i>Aspidisca lynceus</i>	4,479	6,12	64,53	94,3	60	25	493
<i>Bodo saltans</i>	3,062	4,184	68,72	143	150	305	120
<i>Plagiocampa sp</i>	2,27	3,102	71,82	51,4	25	40	260
<i>Vaginicola sp</i>	2,046	2,796	74,61	120	70	50	0
<i>Epistylis sp</i>	1,967	2,688	77,3	0	230	0	0

Tabla 4.19: Resultados de SIMPER. Contribución de especies a la disimilitud entre las estaciones en el reactor MBR. Md: media de disimilitud, Contrib: porcentaje de contribución de cada taxón a la disimilitud en el compartimento.

En el análisis ANOSIM tampoco se identifican diferencias significativas entre los grupos, $p=0,6693$ y $R=-0,0461$. Pero si analizamos los grupos por pares, sí presentan diferencias significativas entre los grupos de muestreo verano y otoño ($p=0,0290$ y $R=0,4477$), aunque son de baja intensidad y podrían darse solapamientos, entre el otoño y el invierno las diferencias son mayores ($p=0,0310$ y $R=0,6111$), por ello se podrían considerar grupos claramente diferentes. En el análisis PERMANOVA sí se detectaron diferencias significativas generales, $F=1,37$ y $p=0,0427$. El estudio por pares verificó las diferencias entre los grupos verano y otoño ($p=0,0301$ y $F=2,258$) y otoño e invierno ($p=0,0297$ y $F=2,017$), que mediante el análisis

ANOSIM, se consideraron también como grupos diferentes la primavera y el otoño ($p=0,0271$ y $F=1,646$).

Así pues, tras el estudio de las diferencias y similitudes, los resultados indican que, en los tres compartimentos, la disimilitud es mayor al 70%, siendo las mismas especies las que determinan el análisis SIMPER, a excepción de *Trochilia minuta*. También hay que destacar que los protistas predominantes son los ciliados, aunque los pequeños flagelados, esencialmente la especie *Bodo saltans* y las amebas testáceas como *Arcella* sp, están siempre representadas.

En cuanto a la similitud entre los grupos de muestras en función de las estaciones del año, la comparación por pares del análisis ANOSIM ha mostrado que en los tres compartimentos existen diferencias significativas entre el verano y el otoño y, por tanto, pueden ser considerados como diferentes, al estar el valor de R entre 0,5 y 0,75. Asimismo el análisis PERMANOVA demostró diferencias estacionales entre la primavera y el otoño, con valores $p<0,05$ y $F>F$ crítico. Verano e invierno en la cámara aeróbica y otoño e invierno en el reactor MBR resultaron grupos diferentes tanto en el análisis ANOSIM como en el análisis PERMANOVA.

4.3.4.2. Especies indicadoras

Este análisis muestra aquellas especies indicadoras dentro de un determinado grupo, como en nuestro caso, las estaciones del año, determinando su relevancia dentro de la comunidad en porcentaje y si esa representatividad es significativa.

Son especies que caracterizan un determinado entorno, por lo que cambios en su presencia y/o abundancia pueden relacionarse con cambios ambientales a lo largo del tiempo. A continuación, se indican para cada compartimento, por este orden, el porcentaje del valor indicador y el grado de significación.

En la **cámara anóxica**, las especies indicadoras (Figura 4.39) relacionadas con la primavera serían *Entosiphon* sp (57,14%, $p=0,0105$), mientras que en verano se han revelado como bioindicadores las amebas desnudas de 20-50 micras (32,52%, $p=0,0432$), cuya abundancia disminuye significativamente en verano respecto a la primavera, así como *Acineta* sp (42,86%, $p=0,0426$), que prevalece en primavera. *Arcella* sp (37,56%, $p=0,0052$) y *Euglypha* sp (35,74%,

Capítulo 4

$p=0,0016$) caracterizan el verano, mientras que *Peranema* sp (46,15%, $p=0,0188$), *Prorodon* sp (50%, $p=0,038$), *Stentor* sp (75%, $p=0,0044$) y *Vaginicola* sp (58,85%, $p=0,01$) determinan la comunidad en otoño. Por último, en invierno, *Aspidisca lynceus* (34,24%, $p=0,046$) con la abundancia más elevada, así como *Vorticella* sp (46,67%, $p=0,0276$) y *Vorticella striata* (47,28%, $p=0,0145$) son especies presentes exclusivamente en esta época del año; las amebas desnudas <20 micras (56,69%, $p=0,0208$) caracterizaron el periodo de lluvias intensas.

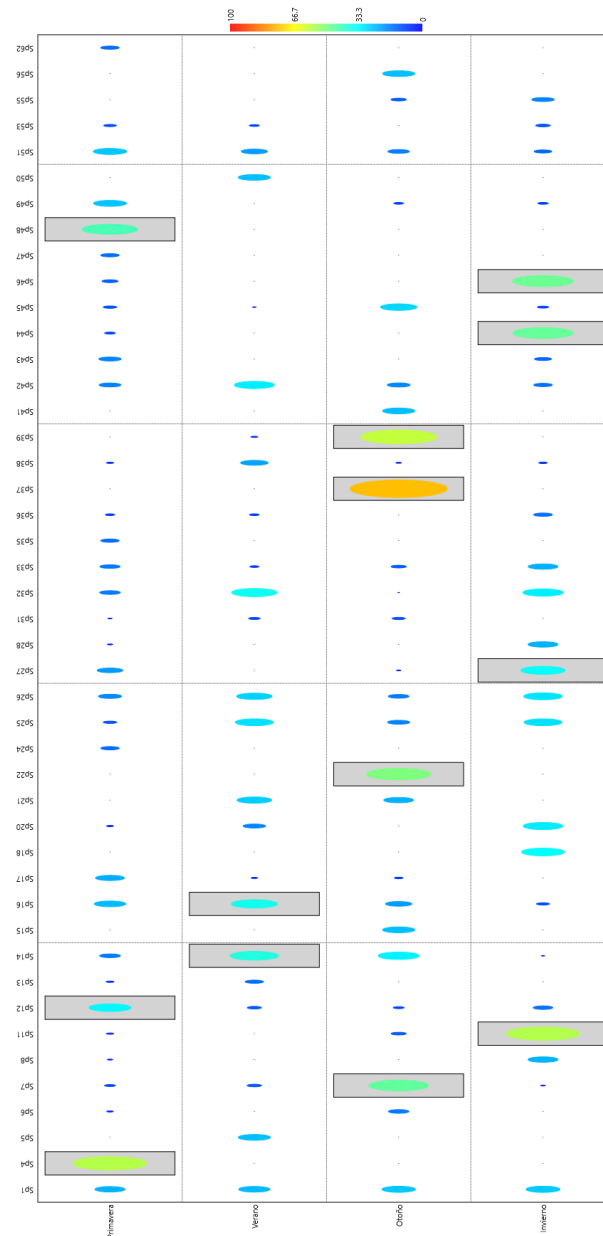


Figura 4.39: Diagrama IndVal de especies indicadoras en la cámara anóxica. En el eje de ordenadas se representan las estaciones, mientras que en abscisas se muestran los taxones. Los recuadros señalan las especies indicadoras. Las especies se muestran codificadas, la Tabla 8.21 del Anexo muestra la correspondencia entre código y especie.

Respecto a la **cámara aeróbica** (Figura 4.40), en el periodo de primavera, las especies que caracterizaron la comunidad fueron *Chilodonella* sp (42,86%, $p=0,047$), que solo se encontraron para este periodo y el complejo *Vorticella convallaria* (34,37%, $p=0,027$) que presentó las abundancias más altas; *Euglena* sp (75%, $p=0,0042$) es una especie exclusiva del verano y *Arcella* sp (39,44%, $p=0,0026$) presentó la abundancia más elevada junto con *Euglypha* sp (47,61%, $p=0,0001$) y *Trochilia minuta* (42,85%, $p=0,0399$); *Tokophrya* sp (43,35%, $p=0,0383$) solo apareció en verano y los rotíferos (38,54%, $p=0,025$) presentaron las poblaciones más abundantes. En lo que concierne al otoño, *Plagiopyla* sp (61,59%, $p=0,0082$), es mayoritaria únicamente en esta estación, mientras que serían especies del invierno *Plagiocampa* sp (46,64%, $p=0,0422$), con la mayor abundancia para este periodo y *Vorticella striata* (42,79%, $p=0,027$), cuya presencia es exclusiva de esta estación.

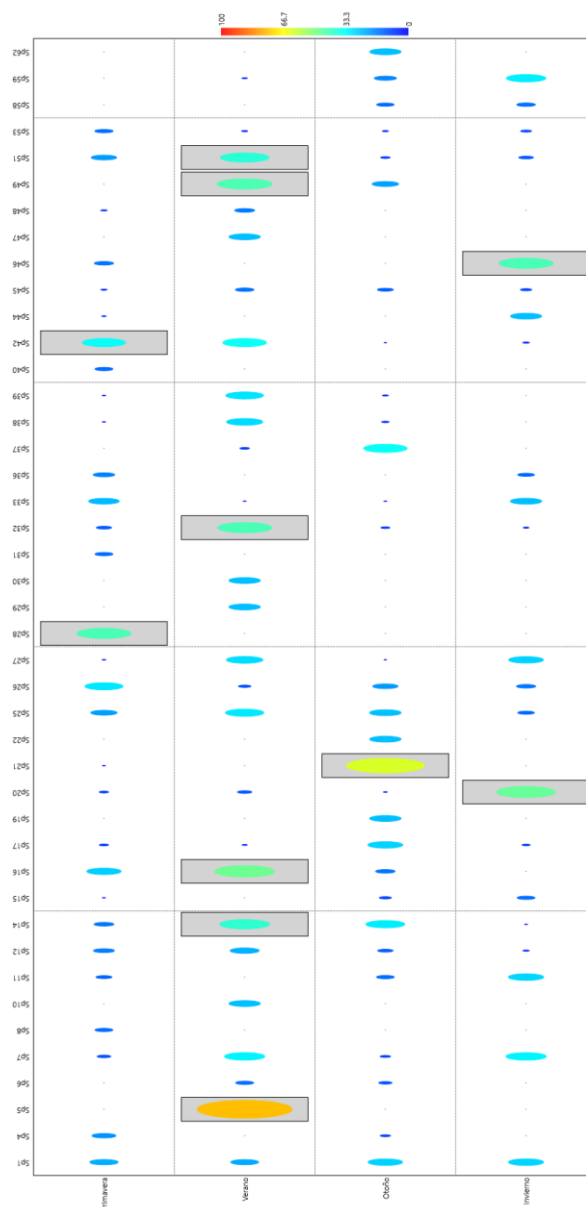


Figura 4.40: Diagrama IndVal de especies indicadoras en la cámara aeróbica. En el eje de ordenadas se representan las estaciones, mientras que en abscisas se muestran los taxones. Los recuadros señalan las especies indicadoras. Las especies se muestran codificadas, la Tabla 8.21 del Anexo muestra la correspondencia entre código y especie.

En el tercer y último compartimento, **el reactor MBR** (Figura 4.41), las especies que se han revelado como indicadoras de las diferentes estaciones son: *Entosiphon* sp (42,29%, $p=0,0228$) y *Epistylis* spp (34,11%, $p=0,043$), que también aparecen únicamente en primavera y las amebas desnudas >50 micras (50%, $p=0,0364$), que se asocian a este periodo. En el verano, *Euglypha* sp (36,04%, $p=0,0093$) y *Vaginicola* sp (56,96%, $p=0,0092$) son las especies más abundantes. *Peranema* sp (43,23%, $p=0,0045$) es una especie indicadora del otoño, con los

mayores valores de abundancia. En el invierno, las especies indicadoras sería, *Plagiocampa* sp (46,08%, $p=0,0237$), con abundancias más elevadas que en otras estaciones y *Vorticella striata* (46,56%, $p=0,0191$), exclusiva de este periodo.

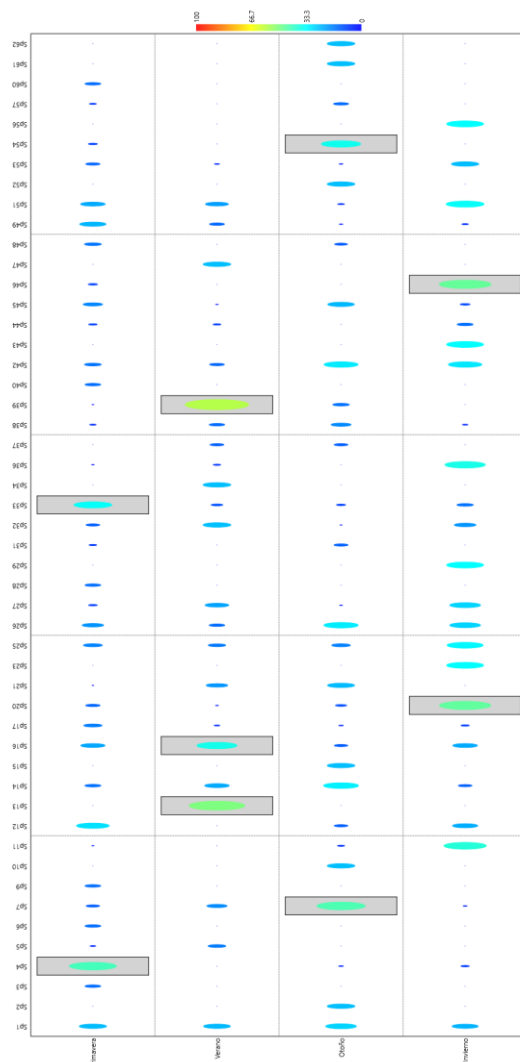


Figura 4.41: Diagrama IndVal de especies indicadoras en el reactor MBR. En el eje de ordenadas se representan las estaciones, mientras que en abscisas se muestran los taxones. Los recuadros señalan las especies indicadoras. Las especies se muestran codificadas, la Tabla 8.21 del Anexo muestra la correspondencia entre código y especie.

4.3.4.3. *Análisis de agrupamiento*

Este agrupamiento nos permite conocer, de manera preliminar o exploratoria, el comportamiento de las especies a lo largo del tiempo en los tres reactores. Se realizó a partir de los datos obtenidos sobre la diversidad beta o reemplazo de especies en el transcurso del tiempo.

El dendrograma de asociación (clúster) entre las abundancias y los reactores durante el periodo de estudio (Figura 4.42), no llegó a mostrar una clara diferenciación entre las diferentes estaciones, aunque si se obtuvieron algunos resultados de interés que se exponen a continuación. Previamente hay que recordar que, como se comentó en apartados anteriores, los tres primeros meses muestreados correspondieron a un periodo de colonización y estabilización de las comunidades microbianas en la depuradora después de su puesta en marcha, periodo en el que, además, las condiciones operacionales en términos de TRH y TRC no fueron las mismas, lo cual se reflejó claramente en el dendrograma obtenido, en el que estas primeras muestras están claramente agrupadas y separadas del resto.

Las muestras de otoño (en marrón) presentaron entre ellas una similitud superior al 60% apareciendo agrupadas en el dendrograma, en invierno (azul), la similitud fue superior al 70%. El muestreo 13 constituye un caso particular que, según hemos comentado en otros apartados, coincidió con un periodo de fuertes lluvias.

Respecto a los meses de verano (en rojo), las muestras se parecen todas entre sí, por lo que se podría afirmar que el verano es una estación con una gran uniformidad en cuanto a la composición y estructura de la comunidad en los tres reactores. Por último, se observaron otros dos grupos, las muestras que precedieron al otoño (5 y 6), y las posteriores a los meses de primavera (17 y 18). En ambos casos, se obtiene entre ellas una similitud superior al 75%.

En cuanto a la primavera (en verde) la interpretación de los resultados resulta más difícil de realizar, ya que, a excepción del muestreo 1, todos los demás meses de primavera presentaron la misma raíz de similitud 50%. Se observó que el muestreo 14 fue más parecido a los muestreos de invierno (muestra 12), y las muestras 15 y 16 más similares a los de verano 17 y 18, en ambos casos con similitudes superiores al 60%. Este hecho podría explicarse porque se trata de una época del año con una mayor variación en cuanto a los factores climáticos.

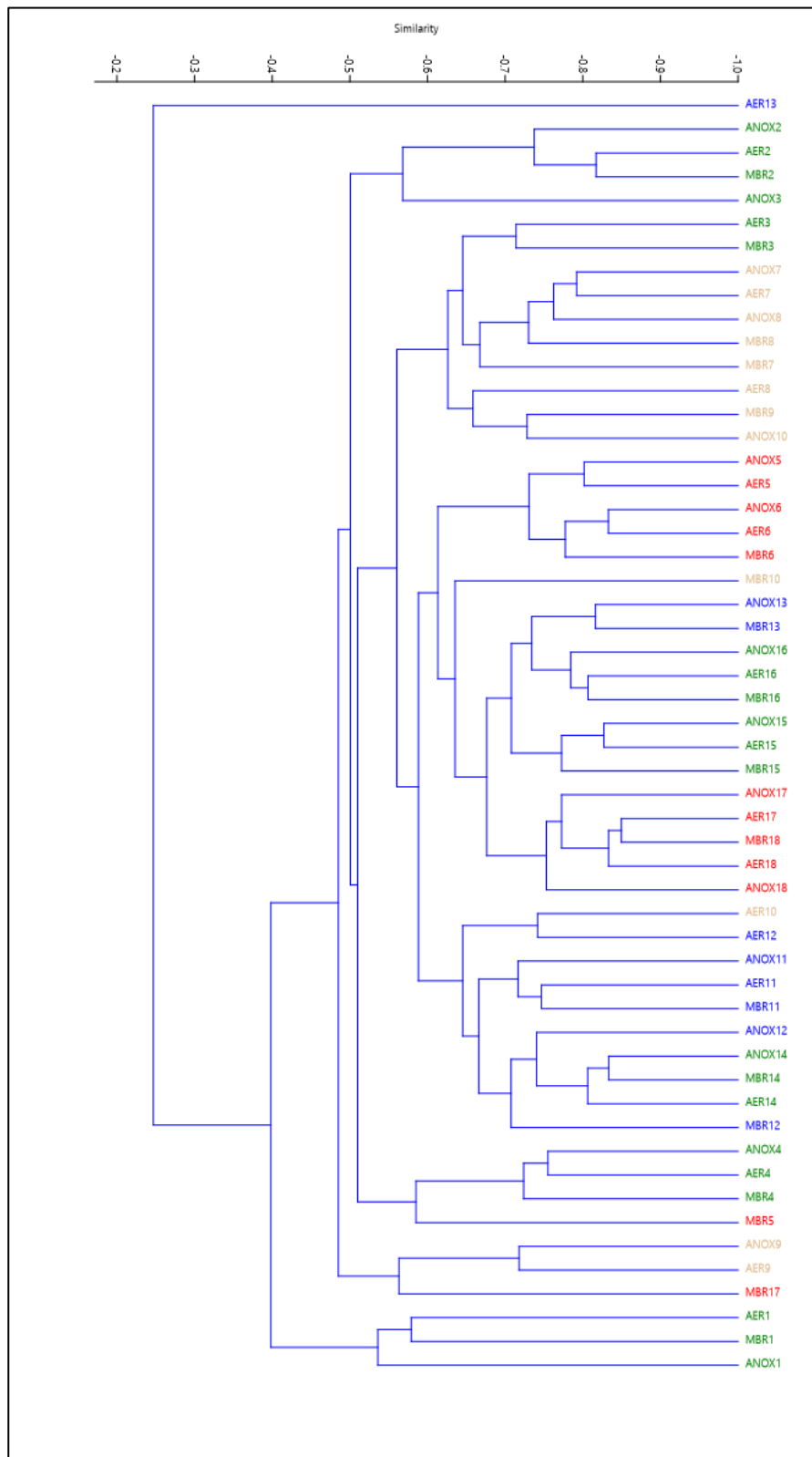


Figura 4.42: Dendrograma de asociación entre la similitud de la abundancia de especies a lo largo del periodo de estudio. Los muestreos en verde corresponden a la primavera, en rojo al verano, el marrón al otoño y el azul al invierno. Los compartimentos se identifican como: ANOX: cámara anóxica; AER: cámara aeróbica y MBR: reactor MBR. Los números hacen referencia a cada una de las muestras.

4.3.4.4. Escalado multidimensional no Paramétrico

Con este tipo de ordenamiento, se pretende representar los muestreos realizados, en un espacio de pocas dimensiones y agruparlos conforme a las abundancias de los diferentes taxones identificados, esperando corroborar lo que se observó en los análisis numéricos de similitudes ANOSIM y PERMANOVA. El objetivo del escalado multidimensional es reducir las dimensiones a dos principales. En algunos de los compartimentos de biorreactor, como veremos a continuación, fue preciso representar las matrices de datos en tres dimensiones.

Para la **cámara anóxica**, fue precisa la representación en tres dimensiones de forma que el nivel de *stress* del método pudiera ser lo suficientemente bueno para explicar la ordenación que se observa. El resultado de *stress* o bondad de ajuste obtenido para la representación 3D del NMDS fue de 0,1856. En el Figura 4.43, observamos que las muestras de otoño y verano quedaron bien diferenciadas de las del invierno, aunque las diferencias solo resultaron significativas entre el verano y el invierno según los resultados de PERMANOVA donde, si bien se observa un ligero solapamiento entre ellos, se pueden considerar periodos diferentes como ya demostró el análisis ANOSIM. Los muestreos de primavera presentaron diferencias significativas con el otoño y el invierno solapó con la primavera, resultado que ya se indicó al estudiar las similitudes.

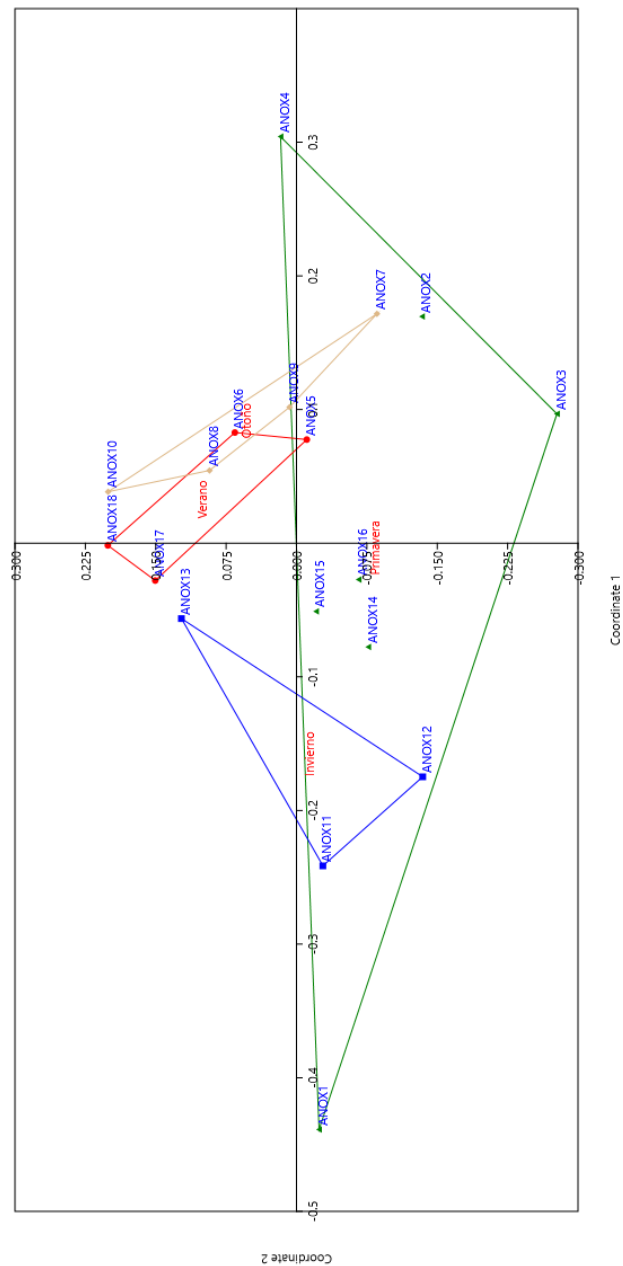


Figura 4.43: NMDS de la representación espacial en 3D de la cámara anóxica. Muestra las similitudes y diferencias entre grupos de muestreo según las estaciones.

El gráfico de ordenación NMDS para la **cámara aeróbica**, Figura 4.44, mostrado en 2D y con un nivel de *stress* de 0,1838, indicó una bondad de ajuste adecuada que permite interpretar claramente el modelo, obteniendo diferencias entre grupos de muestras. El verano y el otoño se representaron en polígonos bien diferenciados, lo cual coincidió con los resultados del análisis ANOSIM, al igual que el verano con el invierno. También se observaron diferencias entre los muestreos de otoño y primavera, aunque en este caso se solaparon ligeramente.

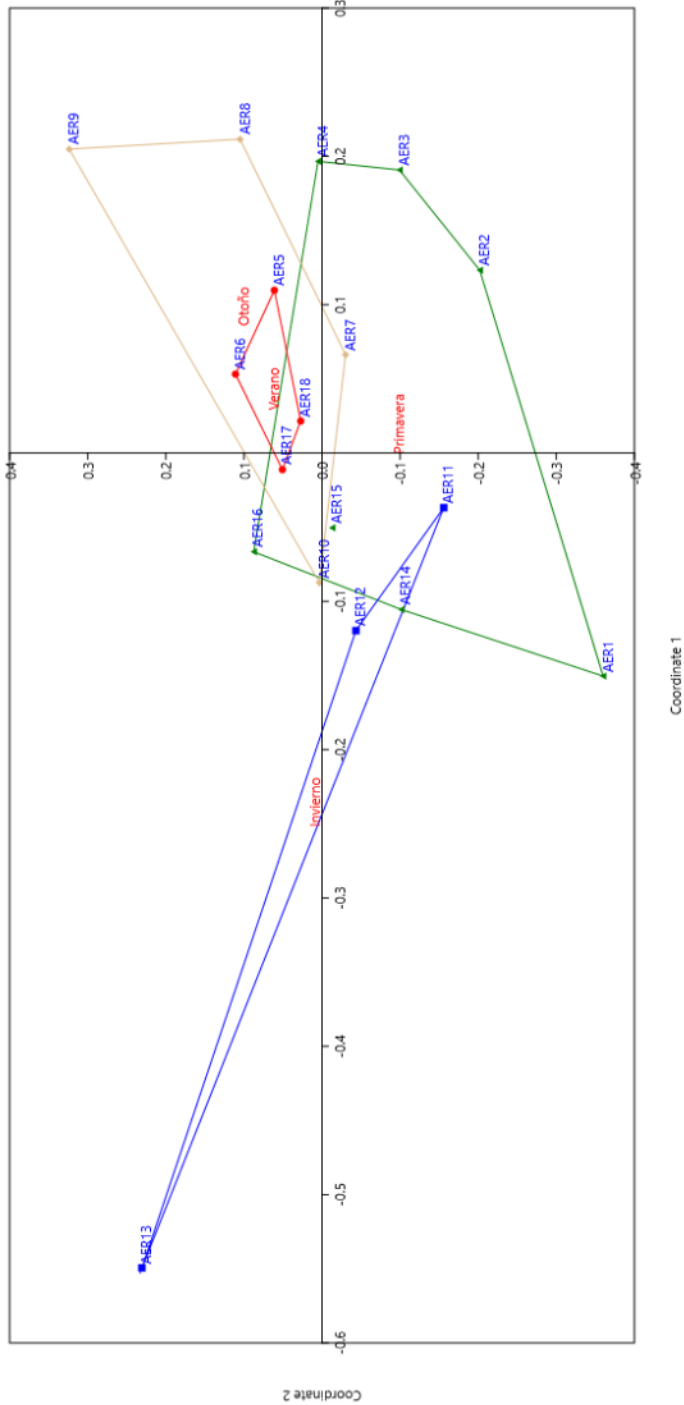


Figura 4.44: NMDS de la representación espacial en 2D de la cámara aeróbica. Muestra las similitudes y diferencias entre grupos de muestreo según las estaciones.

Para el **reactor MBR**, también fueron necesarias tres dimensiones para representar el modelo y que la bondad de ajuste permitiera interpretar el modelo de una manera fiable. El *stress* obtenido para este modelo en representación 3D fue de 0,1854.

Podemos observar que tal y como se determinó con el análisis ANOSIM, aunque existieron diferencias entre el verano y el otoño, hubo un claro solapamiento entre ellos, mientras que el otoño y el invierno aparecen claramente diferenciados ($R=0,6111$).

Esas diferencias se ratificaron en el análisis de PERMANOVA observándose una ligera diferencia primavera-otoño, si bien los polígonos de ambos grupos se cruzan y comparten bastante superficie (Figura 4.45).

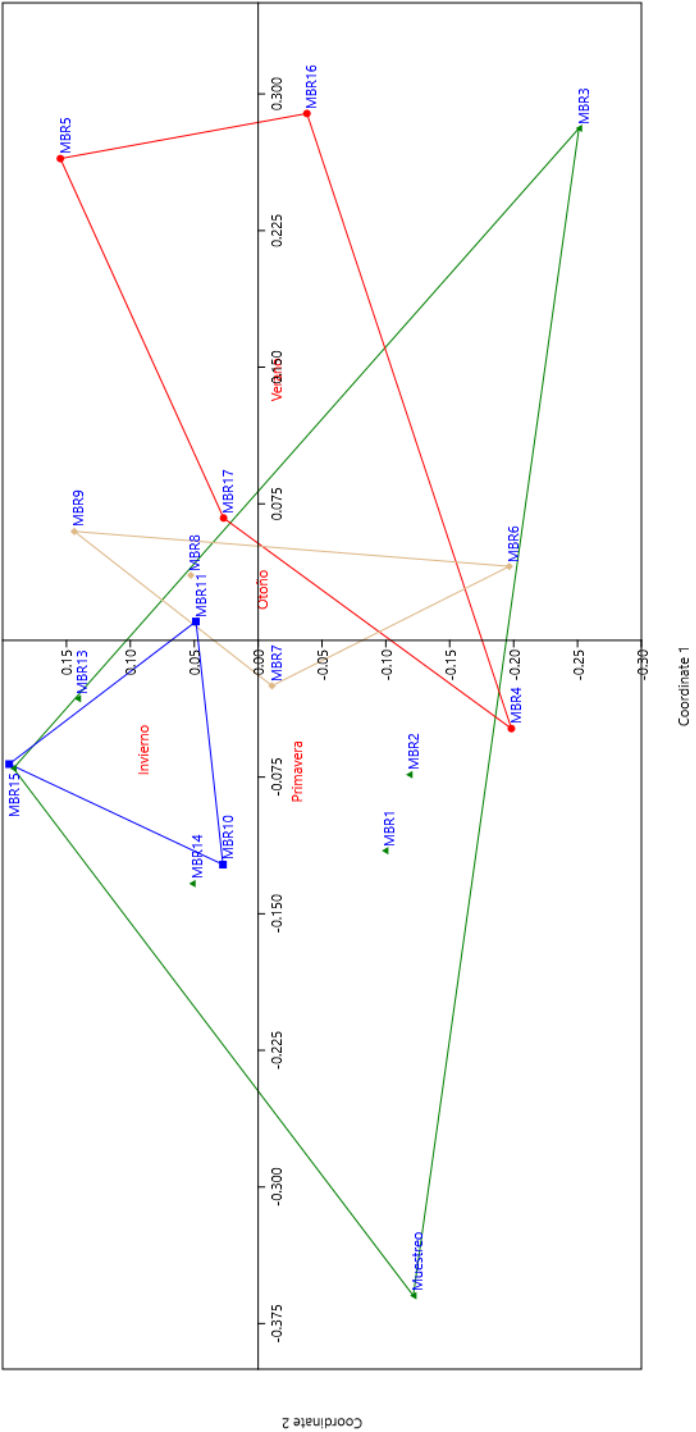


Figura 4.45: NMDS de la representación espacial en 3D del reactor MBR. Muestra las similitudes y diferencias entre grupos de muestreo según las estaciones.

4.3.4.5. *Análisis de Correspondencia Canónica (CCA)*

El siguiente nivel en la interpretación de las interacciones se realizó con el Análisis de Correspondencia Canónica, que permitió abordar la relación entre las especies y las variables ambientales para dar explicación a la interrelación y patrones de ordenamiento y así conocer la dinámica conjunta. Esta estrategia facilitó la identificación de aquellos patrones de cambio que ayudaron a seleccionar bioindicadores de control para mejorar el proceso de depuración, y/o posibilitaron la predicción de cambios en la comunidad de protistas y micrometazoos.

Para este apartado, también se separaron los grupos de variables ambientales para abordar cada uno de ellos por separado, estudiando cómo se comportaron en cada reactor y la respuesta que provocaron en la comunidad.

Para facilitar la interpretación de los resultados procedentes de estos estudios, los taxones se codificaron de la siguiente manera: SpX, donde Sp hizo referencia a la especie o grupo identificado y X al número correlativo de ellos. La codificación completa, común para todos los compartimentos se puede consultar en la Tabla 8.21 del Anexo; la identificación de los sectores del Figura de CCA se va a realizar en el sentido de las agujas del reloj (Figura 4.46), quedando como sigue: Sector 1: cuarto superior derecho; Sector 2: cuarto inferior derecho; Sector 3: cuarto inferior izquierdo y Sector 4: cuarto superior izquierdo.

4	1
3	2

Figura 4.46: Identificación de los sectores del ordenamiento CCA.

Respecto de las variables fisicoquímicas analizadas del influente

En el CCA realizado para la **cámara anóxica** (Figura 4.47), los dos primeros ejes explican el 40,01% de la varianza, correspondiendo un 21,78% al primer eje y un 18,35% al segundo. La prueba de permutaciones de Monte Carlo realizada no muestra que las abundancias estén significativamente correlacionadas con los ejes ($p > 0,05$).

Las variables fisicoquímicas que mayor asociación presentan con la distribución de especies (vectores más largos) son la conductividad, N-NH_4^+ , TON y N-NO_3^- . La distribución de especies a lo largo del eje 2 está equitativamente repartida, con doce especies en la mitad inferior y doce en la superior del segundo eje (CCA 2) pero, estacionalmente hablando, el verano muestra una riqueza de especies muy superior, equivalente a las otras tres estaciones juntas, el verano se encuentra en torno a los valores positivos del eje 2 y la primavera, otoño e invierno en los valores negativos del mismo eje. Las estaciones de primavera, otoño y verano están representadas por las variables NT, N-NH_4^+ y NKjeldahl, siendo todas las demás variables más representativas de verano. Las muestras 15, 16 y 17 presentaron altas concentraciones de N-NO_3^- y TON y los más bajo de NT y N-NH_4^+ , siendo ejes contrapuestos.

Las especies *Trochilia minuta* (Sp 32) y *Plagiocampa* sp (Sp 20) son las que más modulan su comportamiento respecto al TON y N-NO_3^- apareciendo con mayor abundancia cuando estos parámetros son más altos y cuando el NT está en las concentraciones más bajas, en contraposición a *Epistylis* spp (Sp 33), que muestra el comportamiento contrario.

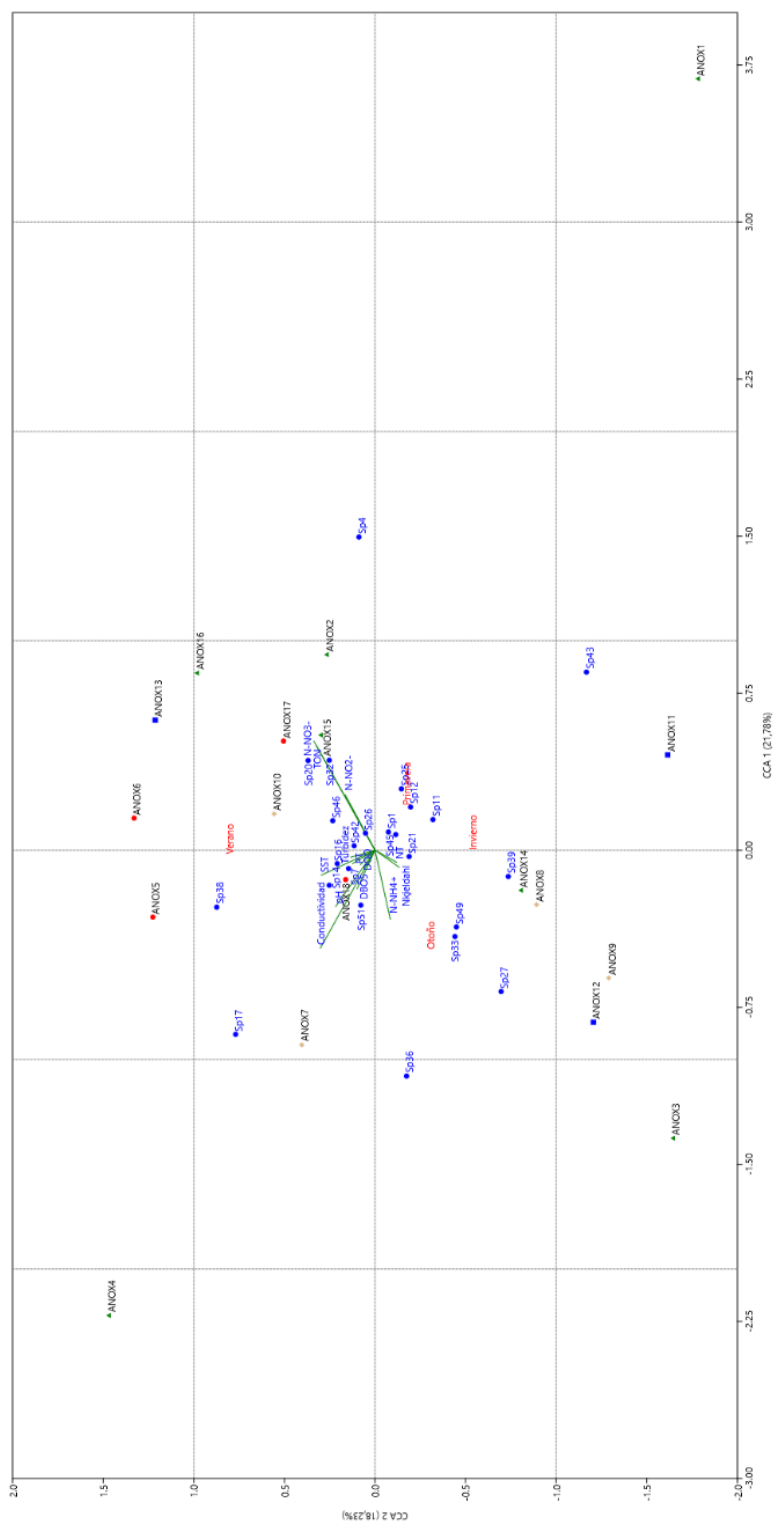


Figura 4.47: Triplot del CCA de la cámara anóxica de la abundancia de especies de protistas y micro-metazoos clasificadas como abundantes y los muestreos realizados. Se representan los dos primeros vectores. Las variables fisicoquímicas del efluente se representan mediante vectores. Las especies se muestran codificadas, la Tabla 8.23 del Anexo muestra la correspondencia entre código y especie. Los colores de cada grupo son: verde, rojo, marrón y azul para la primavera, el verano, el otoño y el invierno respectivamente.

En la **cámara aeróbica** (Figura 4.48), la cantidad de varianza acumulada que explican los dos primeros ejes del CCA es del 43,41%, correspondiendo un 26,41% al primer eje y un 17,00% al segundo. La prueba de Monte Carlo no muestra correlación significativa de las abundancias con los ejes.

Las variables que presentan mayor asociación son la conductividad y el NT y todas las especies de nitrógeno. La sección 1 estaría caracterizada por las concentraciones más altas de N-NO_2^- , N-NO_3^- y TON; la sección 2 no presentó variables moduladoras, mientras que en la sección 3 lo fue por la conductividad, materia orgánica (DBO_5 y DQO) y el amonio, por último, la sección 4 la caracterizan el pH, la turbidez y el fósforo total. En cuanto a los grupos, el invierno y la primavera tienden a acumularse en el sector 1 y el verano y el otoño haría lo propio en el sector tres.

Las especies predominantes y/o asociadas al invierno son las amebas desnudas de menos de 20 micras (Sp 11), *Plagiocampa* sp (Sp 20) y *Vorticella striata* (Sp 46) corroborando, de este modo, los resultados que se obtuvieron en el estudio de especies indicadoras (véase apartado 4.3.4.1.2 de este mismo capítulo). En el sector 3, de verano y otoño, prevalecerían, *Arcella* sp (Sp 14), *Trinema* Sp (Sp 17), *Plagiopyla* sp (Sp 21), *Thuricola* sp (Sp 38), *Vaginicola* sp (Sp 39) y *Tokophrya* sp (Sp 49), como también se indicó en el apartado 4.3.4.1.2 de este mismo capítulo, sobre las especies indicadoras.

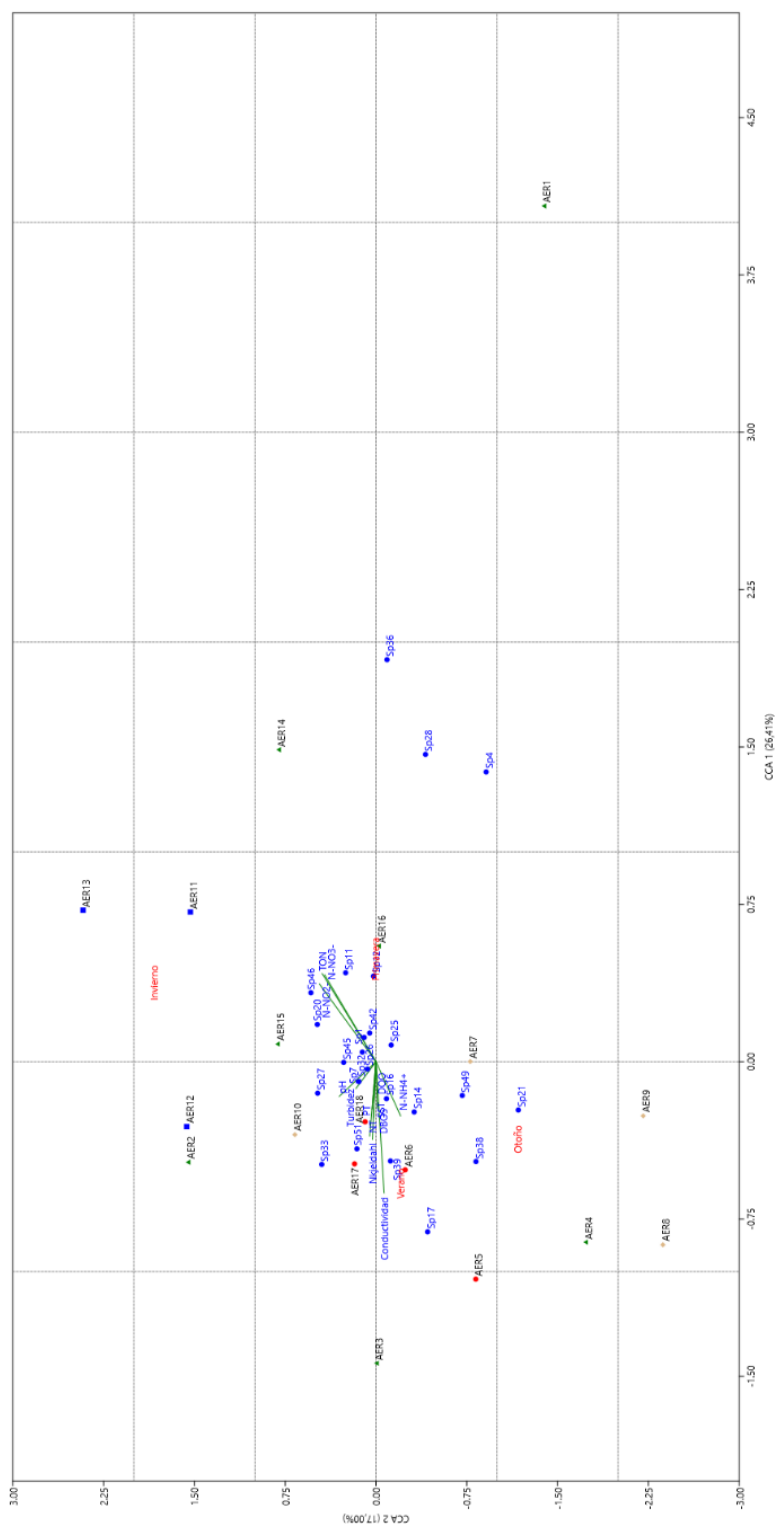


Figura 4.48: Triplot del CCA de la cámara aeróbica de la abundancia de especies de protistas y micro-metazoos clasificadas como abundantes y los muestreos realizados. Se representan los dos primeros vectores. Las variables fisicoquímicas del efluente se representan mediante vectores. Las especies se muestran codificadas, la Tabla 8.23 del Anexo muestra la correspondencia entre código y especie. Los colores de cada grupo son: verde, rojo, marrón y azul para la primavera, el verano, el otoño y el invierno respectivamente.

En el **reactor MBR**, la varianza total explicada por los dos primeros ejes es más baja que en el caso de los dos reactores anteriores, siendo del 38,60%, con una contribución del 20,70% en el primer eje y del 17,90% en el segundo. Para este reactor tampoco hay correlación significativa entre las abundancias y los ejes, el p-valor obtenido es mayor a 0,05.

En esta ocasión, las variables ambientales quedan distribuidas por los cuatro cuadrantes, al igual que las estaciones (Figura 4.49). En el cuadrante uno y dos se agruparían la primavera y el invierno, relacionados con las variables TON, N-NO₂⁻ y N-NO₃⁻ en el cuadrante dos y NT y NKjeldahl en el cuadrante uno. El otoño, cuadrante tres, estaría relacionado con el pH y el amonio, mientras que en el cuadrante cuatro, donde se agrupan los muestreos de verano, se encontrarían relacionados con la DBO₅, SST y la conductividad.

En cuanto a las poblaciones de protistas, la primavera y el invierno (1 y 2) son los que mayor riqueza específica presentan, respecto al otoño y el verano (3 y 4) *Trinema* sp (Sp 17) de nuevo se ve claramente influida por la conductividad. *Vorticella striata* (Sp 46), *Plagiocampa* sp (Sp 20) y las amebas desnudas de tamaño inferior a 20 micras (Sp 11) aparecen de nuevo asociadas a las variables relacionadas con el nitrógeno; TON, N-NO₂⁻ y N-NO₃⁻. A concentraciones de N-NH₄⁺ más altas predominaron las amebas desnudas de tamaño inferior a 20 micras (Sp 11), *Arcella* sp (Sp14).

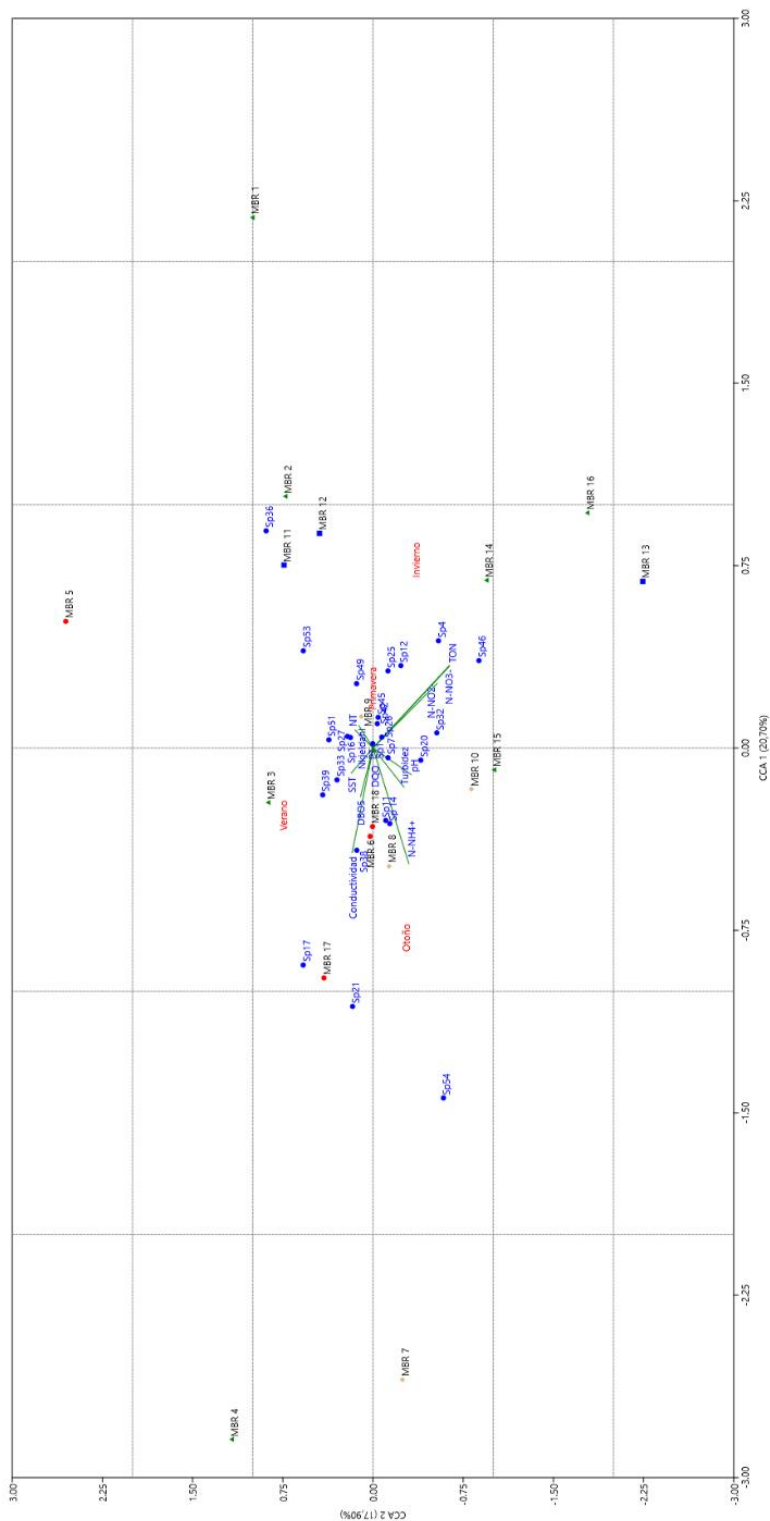


Figura 4.49: Triplot del CCA del reactor MBR de la abundancia de especies de protistas y micrometazoos clasificadas como abundantes y los muestreos realizados. Se representan los dos primeros vectores. Las variables fisicoquímicas del efluente se representan mediante vectores. Las especies se muestran codificadas, la Tabla 8.23 del Anexo muestra la correspondencia entre código y especie. Los colores de cada grupo son: verde, rojo, marrón y azul para la primavera, el verano, el otoño y el invierno respectivamente.

Respecto de las variables fisicoquímicas analizadas del efluente

El siguiente grupo de variables fisicoquímicas que se estudió junto a las abundancias fue el de las analizadas en el efluente.

En la **cámara anóxica** (Figura 4.50), la varianza explicada en los dos primeros ejes es del 40,51%, el primer eje explica el 21,53% y el segundo eje el 18,98%, no habiéndose obtenido correlación lineal significativa entre las abundancias y los ejes tras realizar las permutaciones de Monte Carlo.

Las variables ambientales que más contribuyen en el ordenamiento son la conductividad, NT, PT, DBO₅ y N-NO₂⁻. La primavera queda situada en el primer cuadrante mientras que las otras tres estaciones, se agrupan en el tercero. SST y conductividad explican las variaciones en el primer eje mientras que PT y TON lo harían a lo largo del segundo eje. El pH aparece como variable contrapuesta al PT, DBO₅, y NT, mientras que DQO, conductividad y SST aparecen contrapuestos al amonio y los nitritos.

En cuanto a las especies, éstas presentan un reparto desigual a lo largo del segundo eje, apareciendo mayor riqueza en el sector 2 que en los sectores 1 y 4. Las especies *Entosiphon* sp (Sp 4) y complejo *Vorticella microstomun* (Sp 43) estarían moduladas por concentraciones altas de DBO₅ y NT, mientras que las abundancias más altas de las especies *Trinema* sp (Sp 17) y *Opercularia* sp (Sp 36) se observaron con las concentraciones más altas de DQO y SST. La especie *Peranema* sp (Sp 7) presentó sus abundancias más altas cuando los valores de pH también eran altos.

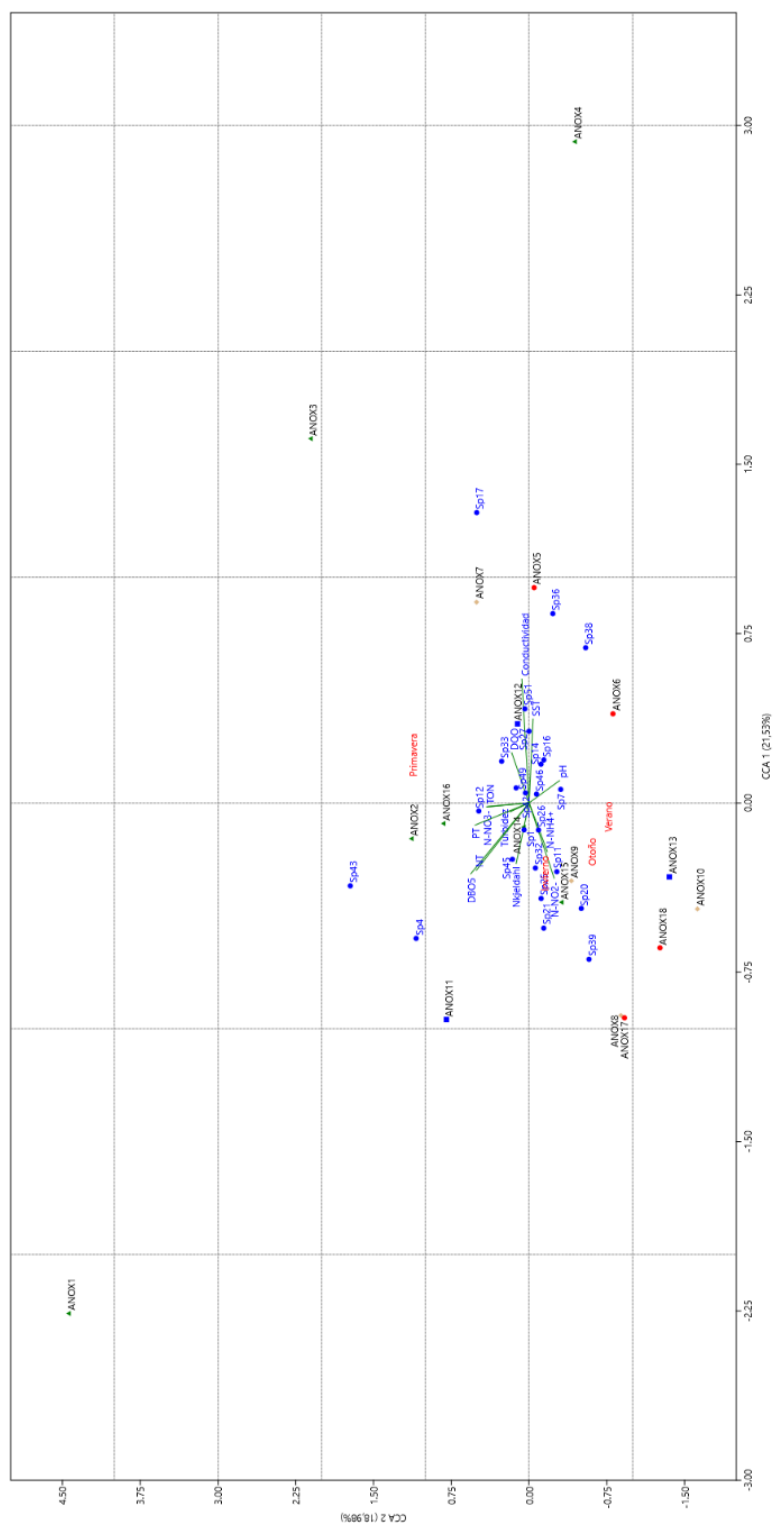


Figura 4.50: Triplot del CCA de la cámara anóxica de la abundancia de especies de protistas y micro-metazoos clasificadas como abundantes y los muestreos realizados. Las variables fisicoquímicas del efluente se representan mediante vectores. Las especies se muestran codificadas, la Tabla 8.23 del Anexo muestra la correspondencia entre código y especie. Los colores de cada grupo son: verde, rojo, marrón y azul para la primavera, el verano, el otoño y el invierno respectivamente.

En la **cámara aeróbica** es donde se explica la mayor cantidad de varianza observada para este conjunto de variables. Se observa en la Figura 4.51 que el porcentaje de inercia explicada es del 49,69%, repartida en el primer eje con un 31,04% y un 18,65% en el segundo eje.

A diferencia de la cámara anóxica, las estaciones quedarían repartidas por cuadrantes, al igual que las variables ambientales. En el sector 1 se representa la primavera, en el dos el invierno, en el sector tres queda representado el verano y en el cuarto y último, el otoño. Las variables que más contribuyen a esta ordenación son la DBO₅ y TON en el sector 1, pH en el sector 3 y conductividad en el sector 4. No se identificaron variables características del sector dos.

La abundancia de *Entosiphon* sp (Sp 4), *Plagiopyla* sp (Sp 21) y *Chilodonella* sp (Sp 28) se ve más influenciada por NT, PT, TON y N-NO₃⁻ mientras que *Tokophrya* sp (Sp 49), *Vaginicola* sp (Sp 39), *Vorticella* sp (Sp 45) y *Plagiocampa* sp (Sp 20) tendrían un comportamiento asociado al pH, N-NH₄⁺ y N-NO₂⁻. Las especies *Trinema* sp (Sp 17), *Epistylis* spp (Sp 33) y *Thuricola* sp (Sp 38) modularían su comportamiento según las concentraciones de DQO y conductividad.

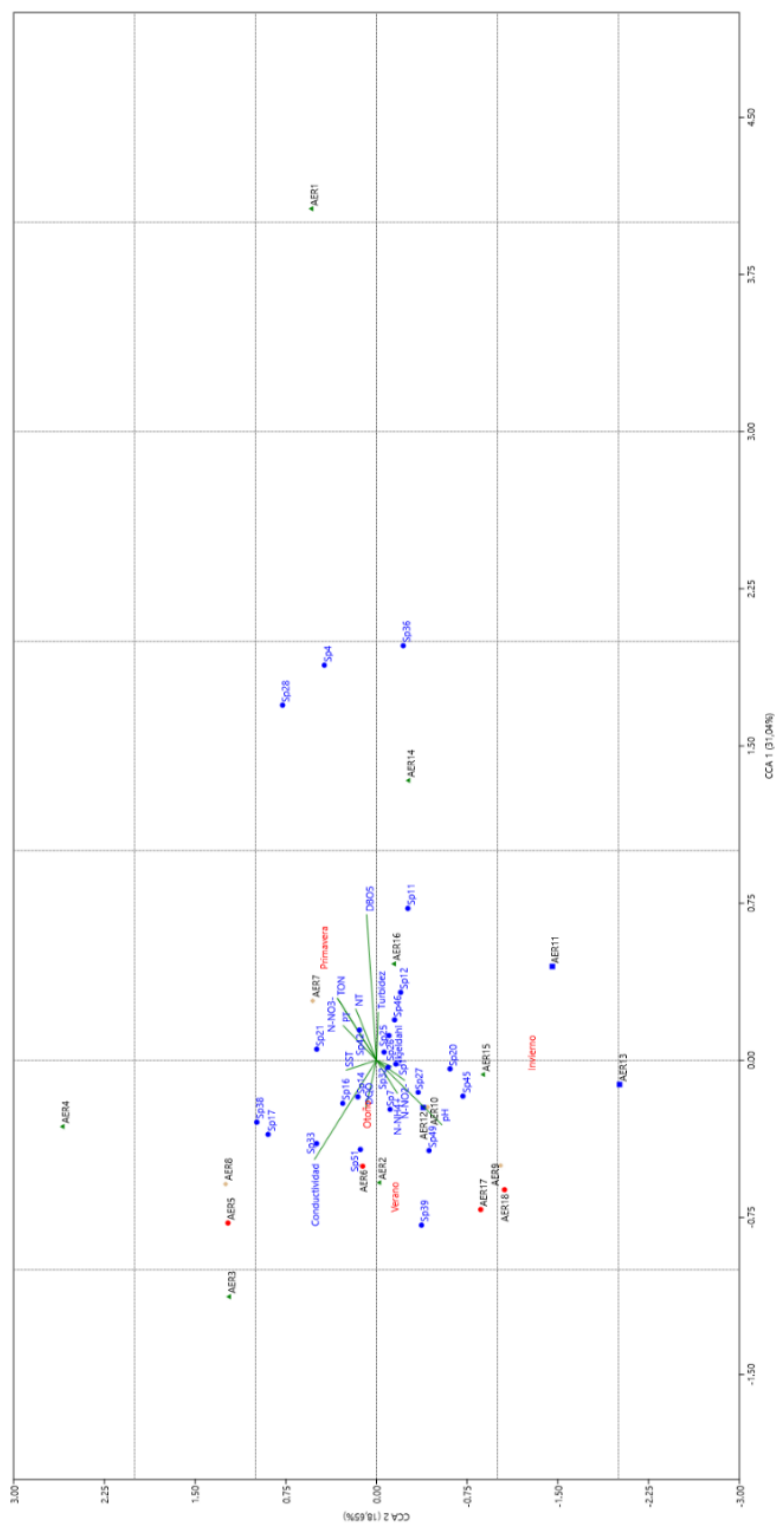


Figura 4.51: Triplot del CCA de la cámara aeróbica de la abundancia de especies de protistas y micro-metazoos clasificadas como abundantes y los muestreos realizados. Las variables fisicoquímicas del efluente se representan mediante vectores. Las especies se muestran codificadas, la Tabla 8.23 del Anexo muestra la correspondencia entre código y especie. Los colores de cada grupo son: verde, rojo, marrón y azul para la primavera, el verano, el otoño y el invierno respectivamente.

Al final del tratamiento biológico, **en el reactor MBR**, la varianza que explica el CCA para las abundancias respecto a estas variables ambientales es únicamente del 37,95%, con un 20,72% explicado por el eje 1 y un 17,23% por el eje dos. No hay correlaciones significativas entre las abundancias y los ejes tras realizar las permutaciones de Monte Carlo.

En la Figura 4.52 se observa que también las estaciones quedaron repartidas por cuadrantes, tal y como se observó en la cámara aeróbica, invierno, primavera, otoño y verano para en los sectores 1, 2, 3 y 4 respectivamente. En este reactor, el número de variables que más contribuyeron al agrupamiento es mayor: NKjeldahl, NT, PT, DBO₅, SST, conductividad, N-NH₄⁺ y N-NO₂⁻. La conductividad y SST modularon el agrupamiento a lo largo del primer eje y pH, nitritos y PT en el segundo.

La mayor riqueza de especies la encontramos en la mitad inferior de la Figura 4.52, coincidiendo con las estaciones de primavera y otoño. Las especies *Trinema* sp (Sp 17), *Thuricola* sp (Sp 38), *Plagiopyla* sp (Sp 21) y *Epistylis* spp (Sp 33) presentan una mayor abundancia a valores más altos de conductividad, SST y DBO₅. Se observó la presencia de las amebas desnudas de tamaño inferior a 20 micras (Sp 11) y *Opercularia* sp (Sp 36) cuando los valores de NT y PT fueron más altos. *Arcella* sp (Sp 14) presentó una mayor abundancia a concentraciones de N-NH₄⁺ más elevadas.

Respecto de las variables operacionales de control de proceso

Muy diferente es el resultado que se obtiene cuando consideramos las variables operacionales del control de proceso junto a las abundancias de protistas y micrometazoos.

En la **cámara anóxica** (Figura 4.53), la varianza explicada es del 63,45%, más de veinte puntos superior que para los dos grupos de variables anteriormente estudiados. De esa varianza acumulada, el 38,04% queda explicada en el primer eje, mientras que, para el segundo, se explicaría el 25,41% de la varianza total. Tras realizar las permutaciones de Monte Carlo encontramos que existe correlación significativa entre las abundancias y los ejes, habiendo obtenido un p-valor < 0,01 para el eje uno y p = 0,02 para el segundo eje. Este conjunto de variables explicaría mucho mejor que los anteriores la ordenación de las especies.

Las estaciones quedarían repartidas de la siguiente manera; el invierno en el cuadrante uno, la primavera en el cuadrante dos y el otoño y el verano comparten agrupamiento en el cuadrante tres. En el invierno, la variable que más contribuye al ordenamiento es la V30, en la primavera destaca la contribución de TRC, mientras que en otoño y verano las variables que mayor influencia presentan sobre la composición de la comunidad fueron el pH y la temperatura. Para el invierno, el muestreo 13 fue en el que se obtuvieron mayores valores de decantación, valores que no son representativos, ya que la ausencia o baja cantidad de fango favorecían mejores decantaciones. En cuanto al TRC, los primeros muestreos, del 1 al 3, es donde se observaron mayores tiempos de retención (hay que recordar en este periodo la ausencia de la recirculación adicional que se instaló posteriormente en la planta).

La mayor riqueza de especies se observa en los cuadrantes dos y tres, coincidentes con los periodos primavera y otoño. La abundancia de las especies *Trinema* sp (Sp 17), *Plagiopyla* sp (Sp 21), *Thuricola* sp (Sp 38), *Vaginicola* sp (Sp 39), *Arcella* sp (Sp 14) y *Peranema* sp (sp 7) estaría vinculada a valores de pH y temperatura más altos, mientras que las especies *Acineria uncinata* (Sp 25), *Aspidisca lynceus* (Sp 27) y *Tokophrya* sp (Sp 49) aparecieron asociadas a temperaturas inferiores. Las especies *Entosiphon* sp (Sp 4) y el complejo *Vorticella microstomum* (Sp 43) quedarían claramente vinculadas a altos tiempos de retención celular, coincidentes con los observados al inicio de la puesta en funcionamiento de la planta.

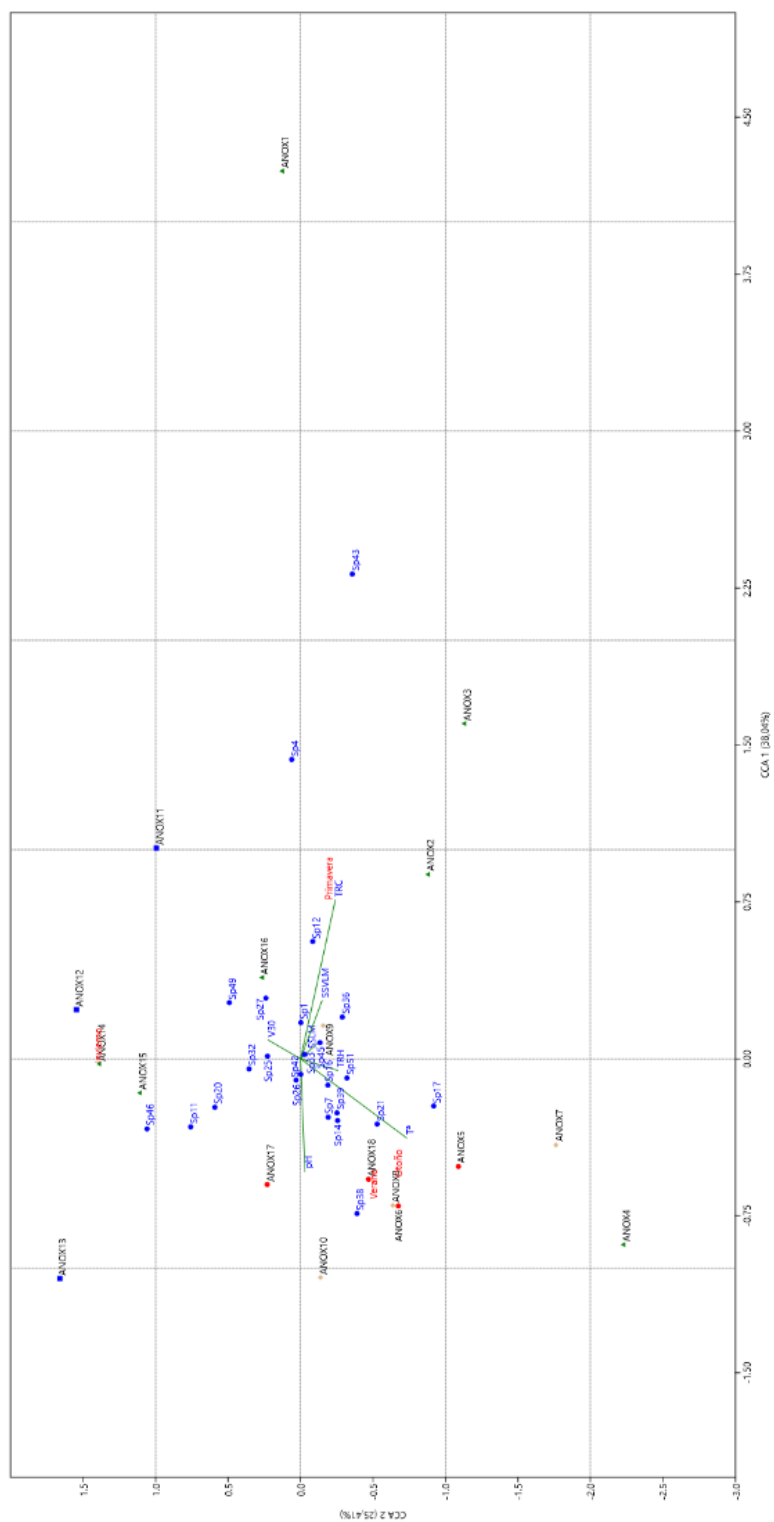


Figura 4.53: Triplot del CCA de la cámara anóxica de la abundancia de especies de protistas y micro-metazoos clasificadas como abundantes y los muestreos realizados. Las variables fisicoquímicas operacionales se representan mediante vectores. Las especies se muestran codificadas, la Tabla 8.23 del Anexo muestra la correspondencia entre código y especie. Los colores de cada grupo son: verde, rojo, marrón y azul para la primavera, el verano, el otoño y el invierno respectivamente.

El comportamiento de las especies en la **cámara aeróbica** (Figura 4.54) es bastante similar a la cámara anóxica. En este caso, la varianza total explicada por los dos primeros ejes es también alta, 63,13%, repartidas por los ejes en 36,47% y 26,66% para el primero y el segundo respectivamente. También existe correlación significativa entre abundancias y ejes, las permutaciones de Monte Carlo proporcionaron una significación de $p=0,055$ para el primer eje y $p<0,01$ en el segundo de ellos.

Las estaciones quedarían repartidas por cuadrantes de modo que encontramos el invierno en el primero, la primavera en el segundo y verano y otoño en el cuarto. Las variables que más contribuyen en este reactor a la ordenación de las especies son la temperatura y la V30, que modulan el comportamiento a lo largo del primer eje, y pH y TRC para el segundo eje. De igual manera que se observó en la cámara anóxica, la V30 caracteriza al invierno, TRC a la primavera y la temperatura y el pH al verano y al otoño.

Las especies quedan distribuidas equitativamente a ambos lados del eje dos: 11 al lado izquierdo y 13 al derecho. Las especies *Opercularia* sp (Sp 36), *Entosiphon* sp (Sp 4) y *Chilodonella* sp (Sp 28) serían las más representativas en primavera, caracterizada por valores altos de SSLM, SSVLM y TRC, mientras que en verano y otoño prevalecen las especies *Thuricola* sp (Sp 38), *Plagiopyla* sp (Sp 21), *Trinema* sp (Sp 17) y *Euglypha* sp (Sp 16), influenciados por el pH en verano y temperatura y TRH en otoño. En invierno las amebas desnudas de tamaño inferior a 20 micras (Sp 11), *Plagiocampa* sp (Sp 20) y *Vorticella striata* (Sp 46) ven modulada su abundancia por cambios en los valores de V30.

En la Figura 4.55 se observa que la varianza explicada en el **reactor MBR** es menor que en los anteriores, siendo la varianza acumulada en los dos primeros ejes del 55,75%, estando distribuida en un 31,88% para el primero y un 23,88% para el segundo. En esta ocasión, tras realizar las permutaciones de Monte Carlo, sólo se observa correlación significativa de la abundancia con el segundo eje, se obtuvo un $p=0,044$.

Respecto a la distribución estacional se aprecia que el otoño y el verano comparten el cuadrante 1 y la primavera y el invierno el 3. Nuevamente el invierno queda caracterizado por la variable V30, la primavera por el TRC y la temperatura y el pH presentan los valores más elevados en verano y otoño.

Se observaron 12 especies en la mitad izquierda del *triplot* y once en el lado derecho, un reparto equilibrado que denota una diversidad equilibrada durante el periodo de estudio. Asociadas a temperaturas más altas aparecen las especies *Thuricola* sp (Sp 38), *Trinema* sp (Sp 17), *Vaginicola* sp (Sp 39), mientras que *Plagiopyla* sp (Sp 21); *Peranema* sp (Sp 7), *Arcella* sp (Sp 14) y *Euglypha* sp (Sp 16) que se asocian con valores más altos de pH. Las especies *Entosiphon* sp (Sp 4), *Vorticella* spp (sp 45) o *Epistylis* spp (Sp 33) resultaron asociadas a valores bajos del TRC y las amebas desnudas de tamaño inferior a 20 micras (Sp 11), amebas desnudas de tamaño entre 20 y 50 micras (Sp 12) o *Plagiocampa* sp (Sp 20) estarían ligadas a valores altos de V30.

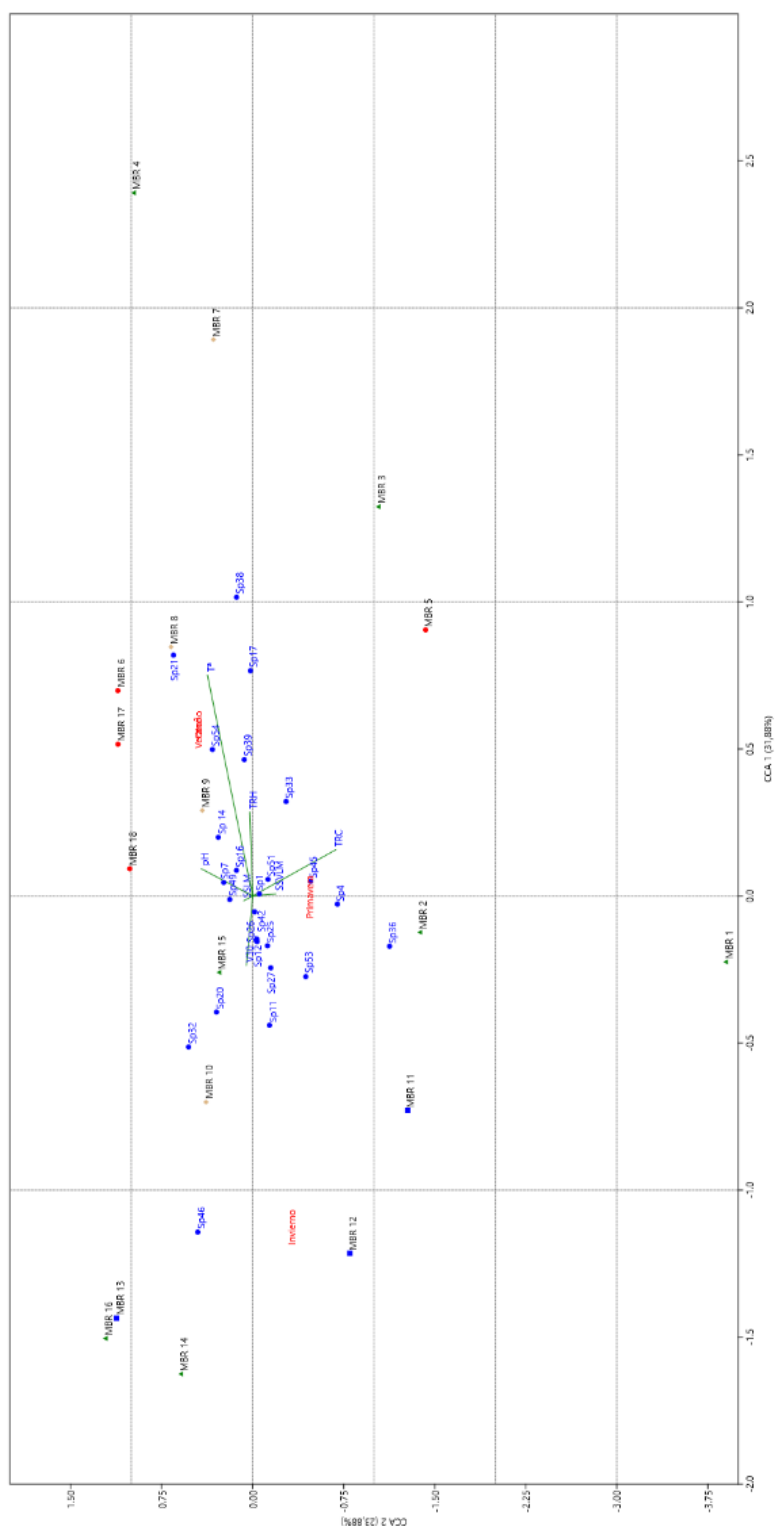


Figura 4.55: Triplot del CCA del reactor MBR de la abundancia de especies de protistas y micrometazoos clasificadas como abundantes y los muestreos realizados. Las variables fisicoquímicas operacionales se representan mediante vectores. Las especies se muestran codificadas, la Tabla 8.23 del Anexo muestra la correspondencia entre código y especie. Los colores de cada grupo son: verde, rojo, marrón y azul para la primavera, el verano, el otoño y el invierno respectivamente.

Respecto de los nutrientes analizados en los compartimentos del biorreactor: nitrógeno y fósforo

Una vez estudiado el agrupamiento de especies y muestreos conforme a las variables fisicoquímicas comunes para los tres compartimentos, se procedió a estudiar la dinámica de la población de cada uno de ellos en base a las variables clasificadas como nutrientes y que fueron analizadas de manera individual en cada uno de los tres compartimentos que componen el tratamiento biológico o secundario de la EDAR Arroyo Valenoso.

En la **cámara anóxica**, la varianza acumulada explicada por los dos primeros ejes resultó alta, del 64,06%, de la cual, el 33,15% fue explicada por el primer eje, mientras que el 30,91% restante fue explicada por el segundo eje (Figura 4.56). En esta ocasión, sólo mostró correlación significativa la abundancia de especies con el segundo de los ejes, siendo la significación de $p=0,02$; mientras que para el primer eje, el valor de p resultó ser mayor a 0,05. Las estaciones quedaron repartidas por cuadrantes y, además, ordenadas, apareciendo la primavera en el cuadrante uno, el verano en el dos, y otoño en el cuadrante tres y finalmente, el invierno en el cuadrante cuatro.

Las variables fisicoquímicas TON y $N-NO_3^-$ explicaron las variaciones a lo largo del eje uno, mientras que el NT, amonio y NKjeldahl explicaron las variaciones a lo largo del eje dos. Estas variables ya mencionadas, junto con $N-NO_2^-$, son las que más contribuyeron a la agrupación de las especies, por ello, podemos interpretar la mayor importancia del nitrógeno en sus diferentes formas, en la distribución de protistas y micrometazoos respecto al fósforo.

La distribución de especies fue muy similar en la mitad derecha e izquierda del eje dos. Las especies *Opercularia* sp (Sp 36), *Astasia* sp (Sp 2), *Aspidisca lynceus* (Sp 27), *Epistylis* spp (Sp 33), *Tokophrya* sp (Sp 49) y *Vaginicola* sp (Sp 39) se asocian a bajas concentraciones de $N-NO_2^-$, $N-NO_3^-$, y TON. La especie *Vorticella* spp (Sp 45) y el complejo *Vorticella microstomum* (Sp 43) estuvieron muy condicionadas por concentraciones altas de NT, NKjeldahl y de $N-NH_4^+$ en el reactor.

La representación de los dos primeros ejes del CCA para la **cámara aeróbica** en relación con los nutrientes analizados en el reactor (Figura 4.57) muestra una varianza acumulada explicada del 57,02%, siendo el 30,98% de ella explicada en el primer eje y el 26,04% restante en el segundo eje. A diferencia de las variables operacionales, no hay correlación significativa entre las abundancias y los dos ejes.

Los grupos quedan ordenados en el sector uno y tres, resultando juntos la primavera y el invierno en el uno y el verano y el otoño en el tercero. La variación a lo largo del eje dos va asociada a $N-NO_2^-$ mientras que para el eje uno es el PT el que modula la agrupación. Estas dos variables, junto al NT y NKjeldahl son las cuatro variables que más contribuyen al agrupamiento.

Doce son las especies que aparecen en la mitad inferior del *triplot* mientras que 11 lo hacen en la parte superior, la diversidad de especies se muestra constante durante todo el estudio. Las abundancias de las especies *Vaginicola* sp (Sp 39) y *Tokophrya* sp (Sp 49) están más vinculadas a concentraciones altas de PT mientras que las amebas desnudas de tamaño entre 20 y 50 micras (Sp 12), *Epistylis* spp (Sp 33) y *Vorticella* spp (Sp 45) lo están respecto a concentraciones altas de nitritos y NT. Las especies más abundantes cuando las concentraciones de $N-NH_4^+$, NT y NKjeldahl son más bajas son *Thuricola* sp (Sp 38), *Uronema* sp (Sp 24), *Plagiocampa* sp (Sp 20), *Chilodonella* sp (Sp 28) y *Vorticella striata* (Sp 46).

El último de los diagramas de CCA es el del **reactor MBR** (Figura 4.58). En él, la varianza que explican los dos primeros ejes es del 57,93%, más baja que en los reactores anteriores, pero más alta que la observada para las variables fisicoquímicas del influente y el efluente. El 37,42% de esta varianza quedaría explicada en el eje uno mientras en el 20,15% restante lo explicaría el eje dos.

La distribución de los grupos coincide con la de la cámara aeróbica, invierno y primavera comparten cuadrante uno, mientras que el otoño y el verano compartirían el cuadrante tres. Todas las variables contribuyen a explicar la variación en la abundancia de las especies observadas y en todos los vectores se localizan en los cuadrantes uno y dos, distinguiéndose dos grupos: N-NO_2^- , N-NO_3^- , N-NH_4^+ y TON en el cuadrante uno y NT, PT y N-Kjeldahl en el cuadrante dos. En esta mitad derecha del segundo eje se presenta un menor número de especies que en la mitad izquierda.

De estas especies, *Opercularia* sp (Sp 36), *Entosiphon* sp (Sp 4), Nemátodos (Sp 53), *Epistylis* spp (Sp 33), *Vorticella* spp (Sp 45) y *Tokophrya* sp (Sp 49) estarían relacionadas con concentraciones altas de las variables señaladas con anterioridad, mientras que *Plagiocampa* sp (Sp 20), *Trochilia minuta* (Sp 32), *Vorticella striata* (Sp 46), *Plagiopyla* sp (Sp 21), *Arcella* sp (Sp 14), *Aspidisca lynceus* (Sp 27) y *Peranema* sp (Sp 7) serían más abundantes a concentraciones bajas.

4.4. Comunidades procariotas desarrolladas en el tratamiento biológico de la EDAR Arroyo Valenoso

Este estudio se realizó considerando al biorreactor como un conjunto, puesto que en un análisis PERMANOVA previo, no se observaron diferencias significativas en la composición de las comunidades procariotas de cada compartimento.

Como resultado de ese análisis se obtuvo un p-valor de 1 y una R^2 de 0,009, por lo que se han considerado las muestras como réplicas. Además, en el NMDS se observa claramente cómo los tres puntos correspondientes a cada compartimento, para cada muestra, están más cerca entre sí que de otras muestras en los mismos reactores, indicando así también que no hay diferencias entre ellas (Figura 4.59). También se observa que las muestras correspondientes al segundo año de muestreo aparecen desplazadas hacia la derecha del primer eje del gráfico NMDS (Figura 4.59), mostrando éstas un cambio, una adaptación o una evolución respecto del primer año de muestreo.

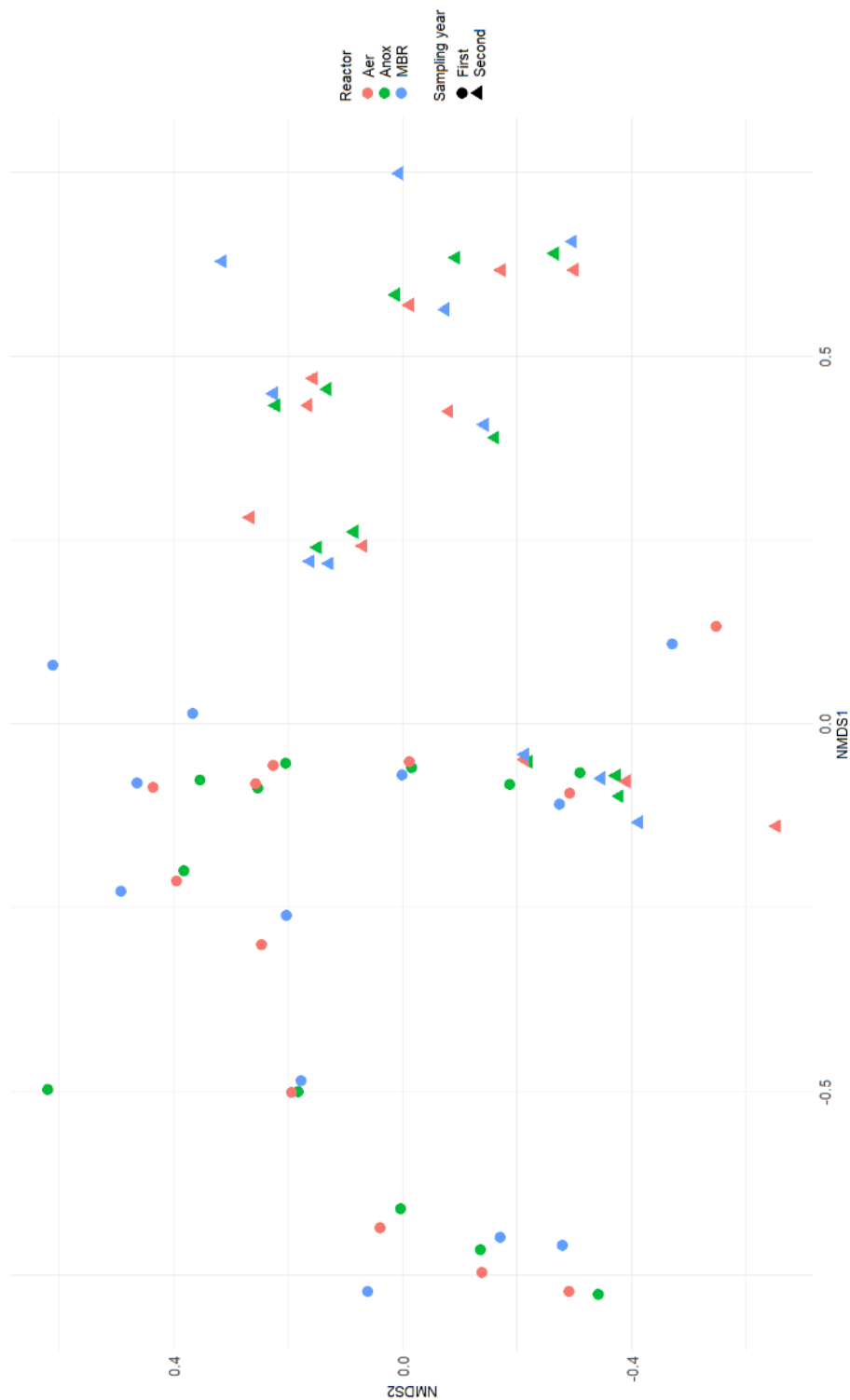


Figura 4.59: Gráfico NMDS de la evolución de las comunidades bacterianas para los tres compartimentos del tratamiento biológico de la EDAR Arroyo Valenoso; se representan los dos primeros ejes. Los círculos corresponden a las muestras del primer año de muestreo y los triángulos al segundo. Aer: cámara aeróbica, en naranja; Anox: cámara anóxica, en verde y MBR. Reactor MBR en azul.

4.4.1. Composición y riqueza de la comunidad

A partir de los ensayos realizados mediante secuenciación masiva se realizaron un total de 3.920.834 lecturas de buena calidad con un promedio de 56.824 de las 69 muestras analizadas y se obtuvieron 9.837 variantes de secuencias de amplicones (ASV).

Las **abundancias relativas** obtenidas para los principales filos del Dominio *Bacteria* fueron: *Proteobacteria* (incluyendo *Alfa-*, *Beta-*, *Delta-*, *Gamma-* y otras *Proteobacterias* menores) $28,26 \pm 3,50\%$, *Bacteroidetes* $20,11\% \pm 3,21\%$, *Chloroflexi* $15,25\% \pm 3,01\%$, considerados como los filos dominantes. *Planctomycetes* $9,19\% \pm 2,01\%$, *Acidobacteria* $7,0\% \pm 2,10\%$, *Actinobacteria* $6,57\% \pm 2,44\%$ presentaron una abundancia relativa intermedia, mientras que los filos *Firmicutes* $2,58\% \pm 0,94\%$ y *Chlorobi* $2,19\% \pm 0,93\%$ presentaron una abundancia relativa baja.

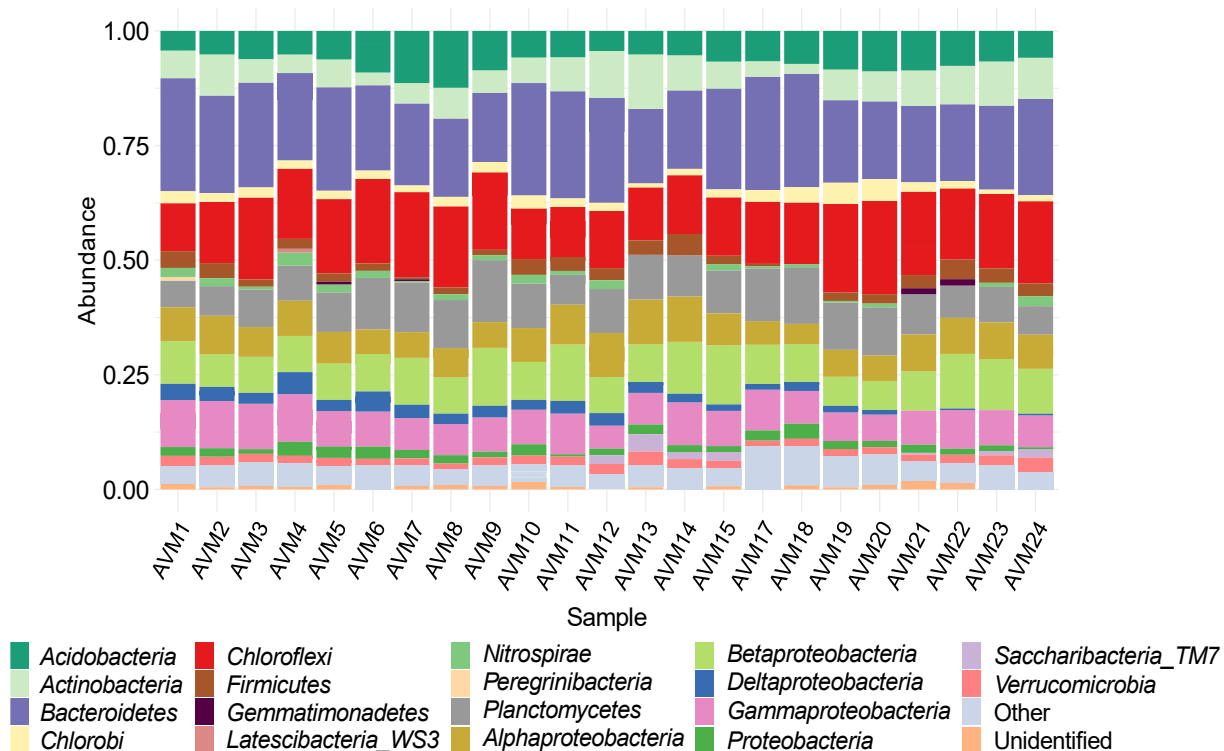


Figura 4.60: Abundancia relativa de los filos dominantes de bacterias del reactor biológico de la EDAR estudiada.

Como se puede observar en la Figura 4.60, la abundancia relativa de los filos bacterianos dominantes mostró una considerable estabilidad durante todo el período de estudio. Hay que destacar que a partir de la muestra 4 se detectó una disminución en la proporción de Gamma-

Proteobacterias con respecto a las tres primeras muestras, un hecho que coincidió con el inicio de la recirculación externa de fango activo desde la cámara aeróbica hacia la anóxica, es decir, se llevó a cabo un cambio en la operación de la EDAR, aportándose biomasa activa por recirculación. También se observó que a partir de la muestra 21, las Delta-Proteobacterias desaparecieron casi por completo, coincidiendo con el incremento de *Cloroflexi* de la muestra 19, momento en el que la comunidad procariota se recupera de los fuertes aportes de agua debidos a las intensas lluvias (muestra 13). Hay que destacar la presencia específica del filo *Gemmatimonadetes* en las muestras 7, 21 y 22. La presencia y abundancia relativa del filo *Nitrospirae*, relacionado con la nitrificación, fue fluctuante a lo largo del estudio. Cabe señalar que estas poblaciones fueron escasas en las muestras 13 y 14 (casi indetectables), muy probablemente debido al aumento del caudal recibido en las instalaciones tras unos días de elevada pluviosidad, ni en las muestras 21 y 22, coincidiendo con la presencia del filo *Gemmatimonadetes* (mencionadas anteriormente).

4.4.2. Estructura de la comunidad

La Figura 4.61 corresponde a la **diversidad alfa**, medida como la serie de números de Hill, hasta D2.

A lo largo del periodo de muestreo, se produce una disminución de la riqueza (número de ASV) procariota en el tratamiento biológico, observándose que la riqueza final era aproximadamente la mitad respecto de la inicial (Figura 4.61 A). En cuanto a la abundancia relativa, como consecuencia de la disminución de la riqueza, también se observa una importante disminución en la comunidad (Figura 4.61 B). Por último, en la Figura 4.61 C, se observa un descenso del número de ASV que presentaban una abundancia muy elevada, prevaleciendo pocos ASV que presenten una clara dominancia en el sistema, destacando *Ferruginibacter* sp como el ASV dominante más significativo. El descenso más acusado en esta abundancia se observa en la muestra 17, como posible consecuencia del periodo de lluvias registrado durante el muestreo anterior. Otra posible causa del descenso de la diversidad podría ser el cambio operacional de la purga de fangos, siendo mayor que el realizado hasta esa fecha. Conforme disminuye el número de especies dominantes se da más peso a las especies raras y se obtienen valores más bajos para D1 y D2.

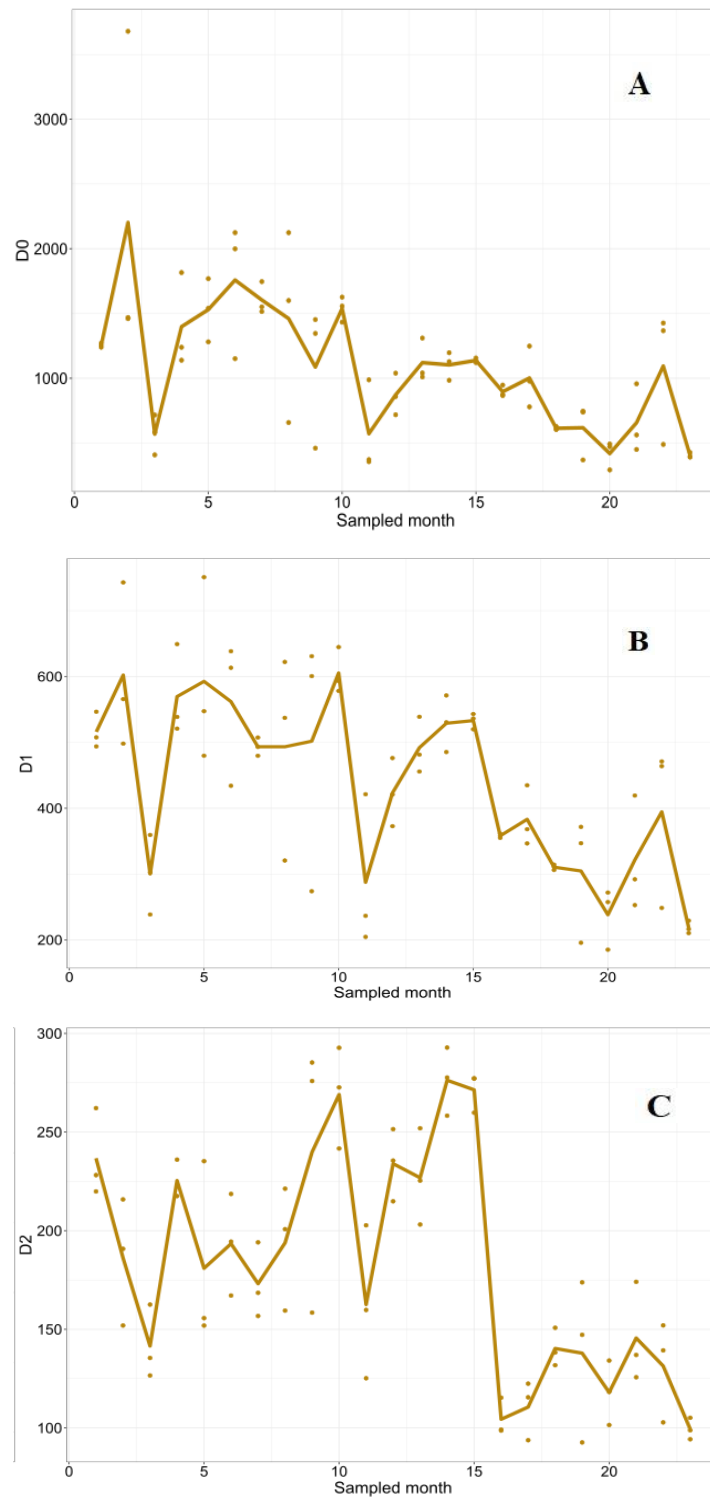


Figura 4.61: Diversidad alfa de la comunidad procariota medida como la serie de Hill hasta D_2 . En el eje de abscisas se representan los muestreos y en el eje de ordenadas la diversidad. **A:** D_0 = número total de especies (S); **B:** D_1 = número de especies abundantes = $e^{H'}$; **C:** D_2 = número de especies muy abundantes = $1/\lambda$. No se dispone de datos para la muestra 16.

Los resultados obtenidos permitirían dividir el periodo de muestreo en tres bloques bien diferenciados. El primero de ellos comprendería las muestras 1 a 3 que correspondería con las muestras tomadas antes de la recirculación adicional de fangos desde la cámara aeróbica hacia la anóxica. El segundo, entre las muestras 4 y 16 (no se incluye la última de ellas por no disponer de datos), su evolución podría explicar la presencia de nuevos grupos bacterianos procedentes del cambio en la recirculación de fangos y/o la variación en la abundancia, que podría ocasionar una desestabilización de la diversidad para posteriormente recuperar valores anteriores e incluso más altos (muestra 15) y, el tercero, comprendido entre las muestras 17 y 24 podría responder al efecto de las lluvias registradas durante el muestreo 16 o al aumento en el caudal de purga, no produciéndose una recuperación de la riqueza y existiendo un desequilibrio entre el número de especies y su abundancia. Otro posible factor de influencia sería que el aumento en la abundancia de algunas especies de protistas pudiera estar relacionado con los cambios en la comunidad procariota.

4.4.3. *Dinámica de la comunidad*

La **diversidad beta** se representa en el Figura 4.62 como un análisis de ordenación NMDS, para el cual se obtuvo un valor de *stress* de 0,109. En ella, se observa un paralelismo entre las muestras del mismo mes en años diferentes, permaneciendo a una altura muy similar en la segunda dimensión (NMDS2), pero estando los muestreos del segundo año desplazados hacia valores más altos a lo largo de la primera dimensión (NMDS1), presentando un patrón periódico no cíclico, ya que las muestras no parecen volver al punto de origen. Además, se observa que los valores de diversidad para las muestras en los meses más cálidos (de mayo a octubre) para ambos periodos de muestreo, se distribuyen por encima del valor cero para la segunda dimensión mientras que los valores de diversidad para las muestras de meses más fríos (noviembre a abril) están por debajo de cero en el mismo eje. Esta evolución en la diversidad podría responder al hecho de que la comunidad bacteriana se acomoda a los cambios operacionales implementados a lo largo del periodo de estudio, recirculación y purga de fangos, como hemos indicado anteriormente; más que a cambios en la composición de ésta por efecto ambiental, ya que al trabajar con valores promedio de las comunidades propias de cada compartimento, en vez de manera individual, se produciría un efecto amortiguador del cambio, mientras que los cambios en la gestión de la instalación sí afectarían claramente a la dinámica de la comunidad.

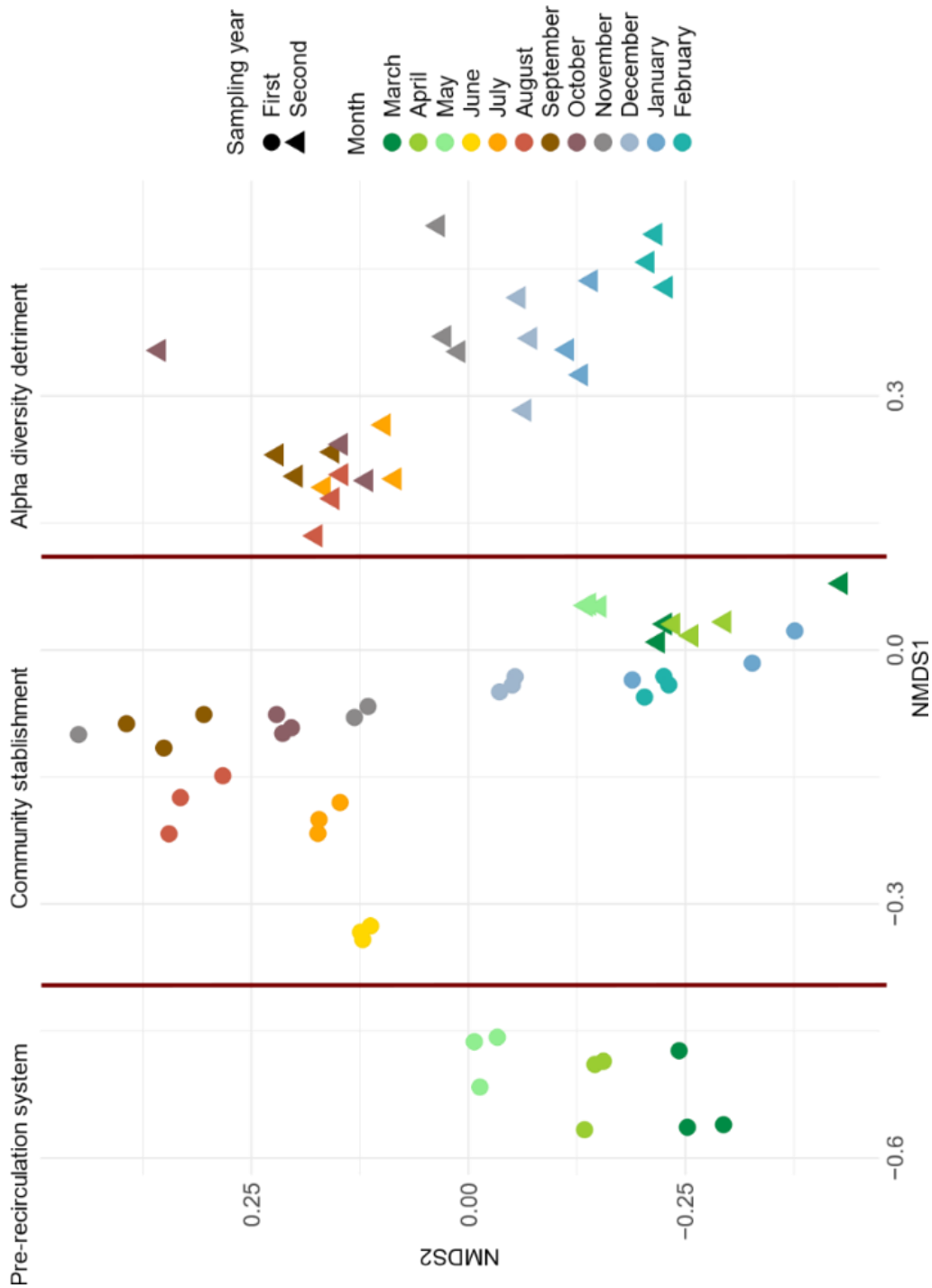


Figura 4.62: Diversidad beta. Representación de las dos primeras dimensiones del análisis NMDS para todo el periodo de muestreo, dividido en tres fases atendiendo a cambios operacionales ocurridos durante el mismo. Izquierda: periodo sin recirculación desde la cámara aeróbica a la anóxica; Centro: periodo de estabilización de la comunidad; Derecha: pérdida de diversidad debido a las lluvias registradas durante los muestreos de marzo y junio (sin datos) del segundo año, como consecuencia del aumento del caudal de purga de fangos a partir de octubre del segundo año y/o como proceso de estabilización de la comunidad en el sistema.

En el análisis de redundancias realizado (Figura 4.63), la varianza explicada en los dos primeros ejes es de 41,56%. Se observa que la distribución de las comunidades a largo del segundo eje (RDA2) se agrupa según la época en la que se realizaron los muestreos, quedando por encima de cero aquellos muestreos comprendidos entre los meses de mayo a septiembre, periodo cálido (primavera y verano), y que por debajo de cero se agrupan los muestreos realizados de octubre a marzo, periodo frío (otoño e invierno). Durante el primer periodo de muestreo (doce muestras), se observa que las comunidades bacterianas quedan correlacionadas con concentraciones de fósforo total (TP, en la Figura 4.63) y DQO (COD, en la Figura 4.63) más altas, mientras que, por el contrario, en el segundo muestreo son las concentraciones de nitrógeno de amonio (reflejado como NH_3 en la Figura 4.63) y sólidos del licor mezcla (SSLM, en la Figura 4.63) las que mejor explicarían el comportamiento de la comunidad de procariotas.

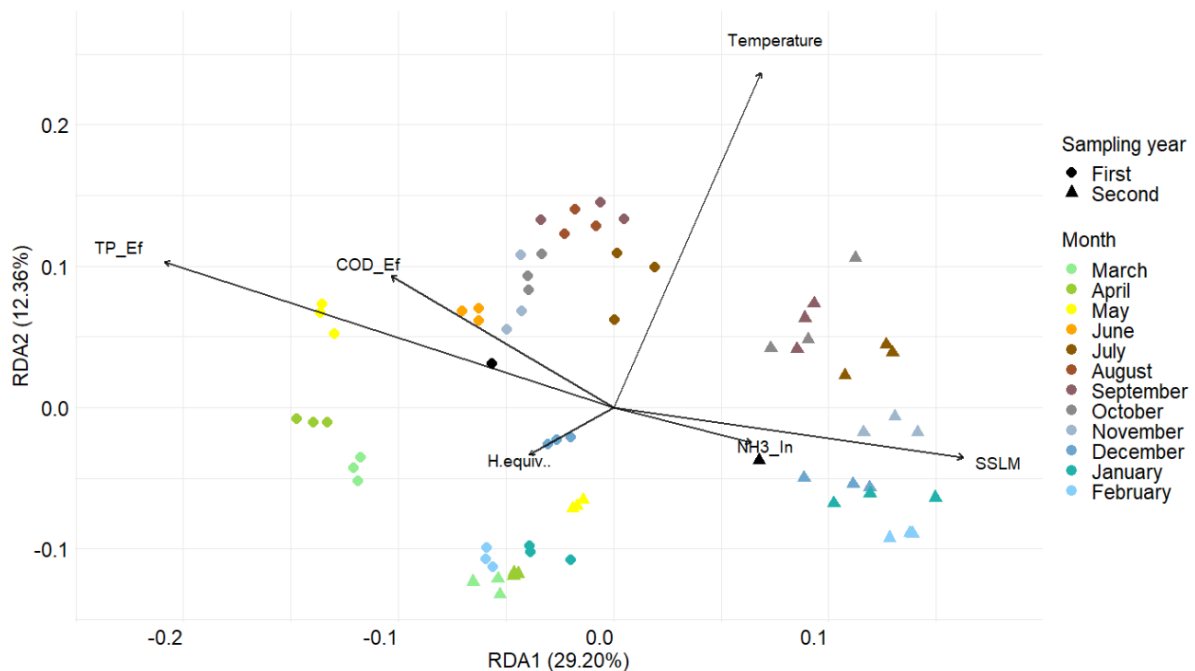


Figura 4.63: Análisis de redundancia (RDA). Los círculos y triángulos corresponden a cada muestra en el primer o segundo año de muestreo, respectivamente. Los puntos negros representan el centroide del primer y segundo año de muestreo. El color es indicativo del mes de muestreo y las líneas muestran los factores fisicoquímicos restringidos en la ordenación. Se incluyen los parámetros que más se correlacionan con los OTU.

4.5. Estudio integral de la comunidad microbiana total presente en el reactor biológico de la EDAR Arroyo Valenoso

Una vez estudiadas las dos principales comunidades de microorganismos presentes en el fango activo de la EDAR, y utilizando los resultados obtenidos para cada una de ellas, se combinaron los datos obtenidos para conocer cómo interactúan entre ellas, mediante la representación de redes de coocurrencia (Figura 4.64). La red se construyó utilizando correlaciones significativas (probabilidad de coocurrencia superior a 0,95) entre la abundancia de protistas y la abundancia de la comunidad procariota a nivel de ASV. Se identificaron cuatro taxones de protistas que presentaban correlación con la comunidad de procariotas: *Entosiphon*, *Litonotus*, *Pseudochilodonopsis* y *Thuricola*, así como un grupo de micrometazoos, los ácaros.

Destacan, por su relevancia en el proceso de depuración o eliminación de contaminantes o por su interés sanitario, los taxones bacterianos siguientes: *Nitrospira*, *Nitrosomonas* (nitrificación), *Zooglea*, *Arenimonas*, *Acinetobacter* (formación del flóculo) *Thiotrix*, *Nocardia* y *Nocardioides* (formación del flóculo, problemas de sedimentabilidad cuando se desarrollan en exceso: *bulking*), *Ferruginibacter* (degradación de materia orgánica), *Accumulibacter*, *Gemmatimonadetes* (eliminación de fósforo), *Clostridium*, *Ruminococcus* (degradación de materia orgánica, potenciales patógenos humanos), *Pirellula*, *Gemmata* (nitrificación tipo *anammox*), *Methylosarcina* (metanotrofo), *Stenotrophomonas* (ciclo del nitrógeno, reducción de nitritos; potencial patógeno humano) *Legionella* (patógeno humano) *Anaeromyxobacter* (reductores de hierro vía nitrato).

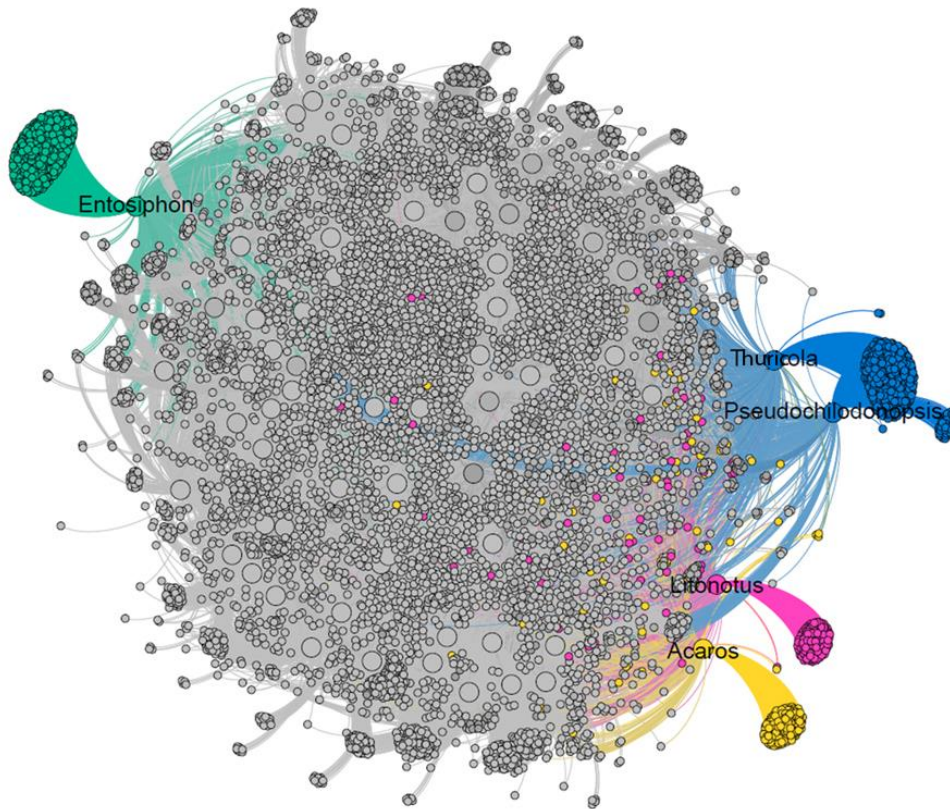


Figura 4.64: Correlación de rango de Spearman entre protistas y micrometazoos respecto a la comunidad bacteriana. Aparecen coloreados cuatro (4) módulos donde determinados ASV de bacterias sólo se correlacionaron de manera significativa con un protista o micrometazoo.

4.6. Detección y cuantificación de grupos procariotas implicados en la nitrificación

4.6.1. Detección y cuantificación de los grupos AOB y NOB

El estudio para determinar la abundancia de los grupos bacterianos implicados en la nitrificación (AOB y NOB, bacterias nitrificantes clásicas) en las cámara anóxica y aeróbica mostró que la proporción de bacterias oxidantes de nitritos es ligeramente inferior a la de oxidantes de amonio (Figura 4.65). La presencia de estos grupos bacterianos, en ambos reactores, fue cercana al 10%, en concreto, el análisis realizado con sondas específicas determinó un porcentaje, respecto al total de bacterias viables, del 9,95% y 11,19% para AOB y del 9,36% y 10,88% para NOB en la cámara anóxica y aeróbica respectivamente. Los resultados completos se pueden consultar en la Tabla 8.34 del Anexo.

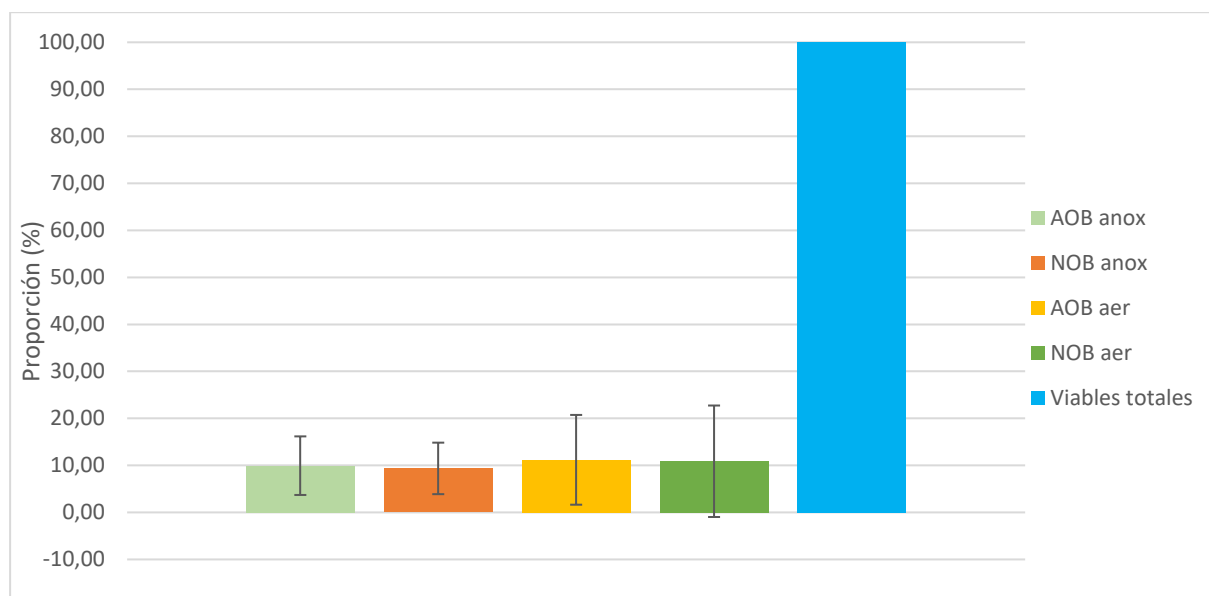


Figura 4.65: Proporción de bacterias amonio y nitritos oxidantes en el reactor A/O respecto del total de bacterias viables. AOB anox: bacterias amonio oxidantes en la cámara anóxica; NOB anox: bacterias nitrito oxidantes en la cámara anóxica; AOB aer: bacterias amonio oxidantes en la cámara aeróbica; NOB aer: bacterias nitrito oxidantes en la cámara aeróbica.

Los resultados obtenidos indicaron que no hubo pérdida de viabilidad en las poblaciones de bacterias nitrificantes entre ambos reactores, probablemente por la influencia de la recirculación de los fangos desde la cámara aeróbica y MBR hacia la cámara anóxica, que permite

mantener la estabilidad de las poblaciones en el proceso y asegurar la eficacia en el rendimiento de eliminación de nitrógeno en la EDAR.

Al microscopio de fluorescencia, las bacterias nitrificantes se observaron como agregados dentro del flóculo, muchos dispuestos en su superficie (Figura 4.66). Fue frecuente encontrar ambos grupos próximos uno al otro, aunque también se encontraron con mayor distancia entre ellos. No en todos los flocúlos se detectó la presencia de algún grupo de nitrificantes y, en alguno de ellos, solo se observaron bacterias amonio oxidantes o nitrito oxidantes.

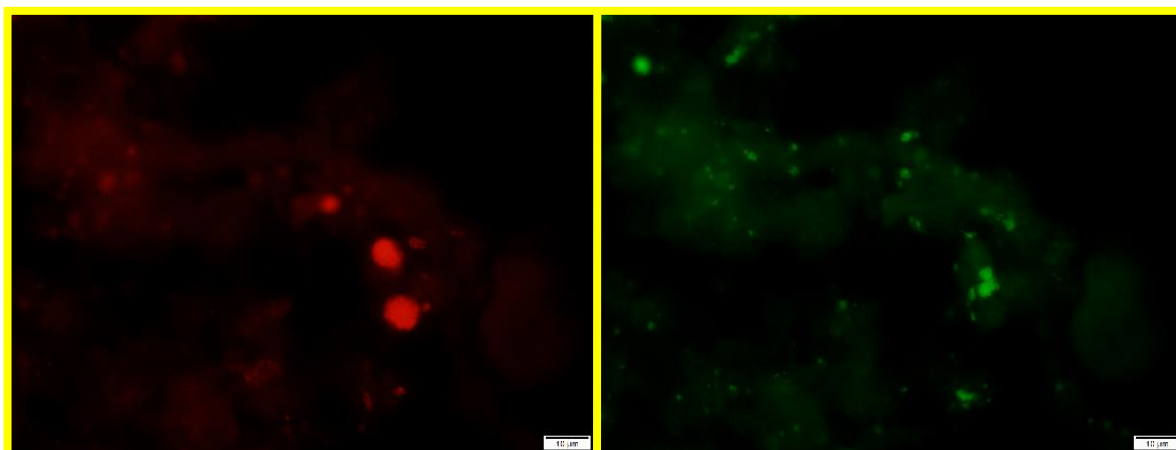


Figura 4.66: Microfotografías correspondientes a células marcadas presentes en los flóculos. Observación del grupo funcional amonio oxidantes en rojo (izquierda) y del grupo funcional nitrito oxidantes en verde (derecha). Imagen perteneciente a un flóculo de la cámara aeróbica de la muestra AVM12.

4.6.2. Detección y cuantificación del grupo de bacterias *comammox*

4.6.2.1. Mediante FISH

En las Figura 4.67 y 4.68 se observan las muestras hibridadas con la sonda *Ntspa476*, específica para *Candidatus Nitrospira nitrosa* y *Nitrospira nitrificans*, representantes de las bacterias *comammox*, así como el género *Nitrospira* hibridado con la sonda *Ntspa662*. El análisis de estas imágenes reflejó que la presencia de bacterias *comammox* representó el 26% respecto del total de bacterias de la comunidad en la cámara aeróbica del reactor biológico (mezcla de las sondas EUB 338, 338II y 338III), si bien es cierto que la adquisición de las imágenes no se realizó al azar, es decir, se eligieron flóculos con respuesta positiva a la sonda fluorescente, por tanto, el porcentaje puede estar sobrestimado.

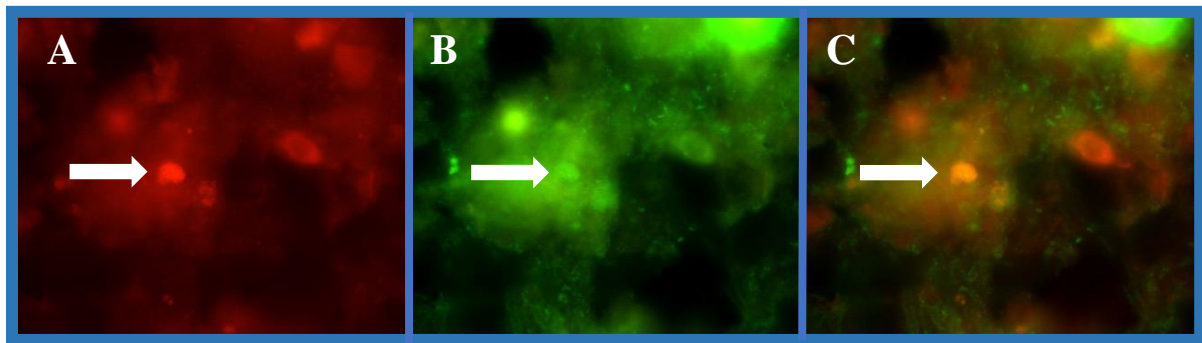


Figura 4.67: Muestra AER1; A) Comammox (*Ca. Nitrospira nitrosa*, *Ca. Nitrospira nitrificans*) sonda Ntspa0476, flecha blanca 1000X; B) Eubacteria mezcla de sonda EUB 338I, 338II y 338III, Comammox (*Ca. Nitrospira nitrosa*, *Ca. Nitrospira nitrificans*) flecha blanca 1000X; C) Eubacteria mezcla de sonda EUB 338I, 338II y 338III y Comammox (*Ca. Nitrospira nitrosa*, *Ca. Nitrospira nitrificans*) Sonda Ntspa0476 (naranja), flecha blanca 1000X.

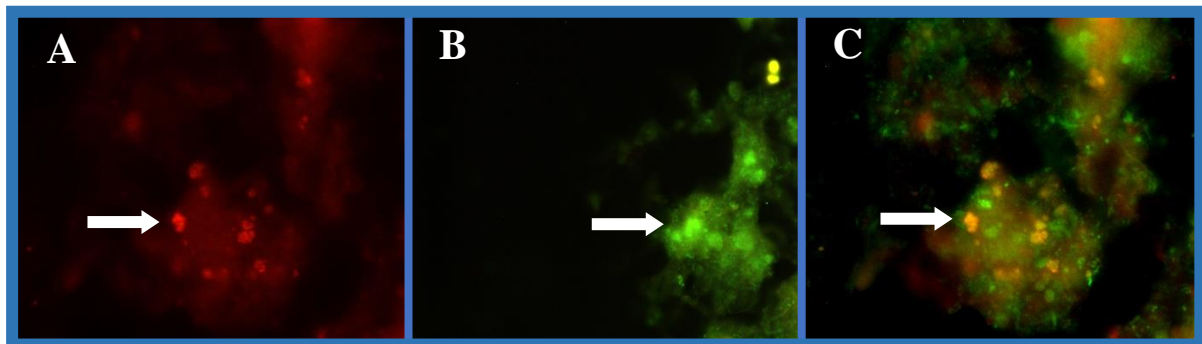


Figura 4.68: Muestra AER1: A) Género *Nitrospira* sonda Ntspa662, flecha blanca 600X; B) Eubacteria mezcla de sonda EUB 338I, 338II y 338III, género *Nitrospira* flecha blanca 600X; C) Eubacteria mezcla de sonda EUB 338I, 338II y 338III y género *Nitrospira* sonda Ntspa662 (naranja) flecha blanca 600X.

4.6.2.2. Mediante técnicas PCR: detección de los grupos procariontas comammox y AOA

Para cuantificar las bacterias *comammox* mediante PCR se recurrió a dos de las variantes de la técnica original, la PCR cuantitativa en tiempo real y la PCR digital, no habiéndose obtenido resultados concluyentes con la primera de ellas por complicaciones en la puesta a punto de los protocolos de ensayo específicos, al carecer de una cantidad adecuada de ADN molde que permitiera la amplificación bajo los criterios establecidos.

Sin embargo, se pudieron realizar ensayos mediante PCR digital en los que se obtuvieron los resultados que se muestran en el Figura 4.69. Se muestran valores promedio; los resultados completos se pueden consultar en la Tabla 8.35 del Anexo.

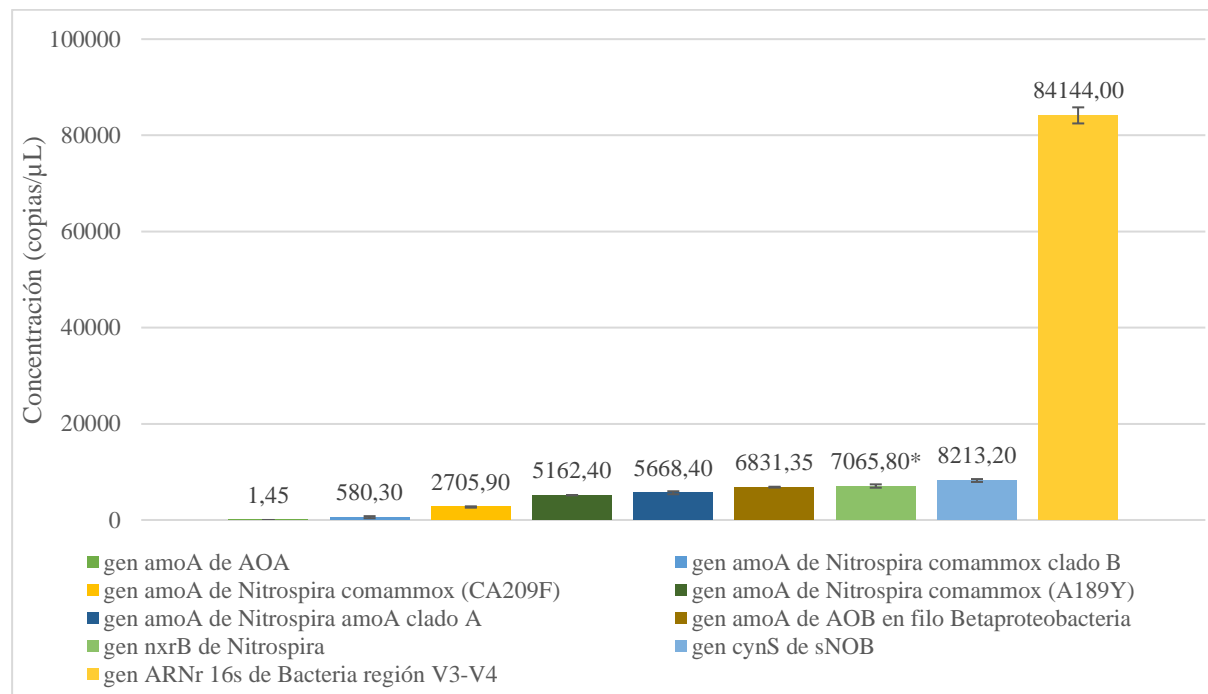


Figura 4.69: Concentración promedio, en copias/μL, de cada una de las dianas analizadas correspondientes a bacterias/arqueas nitrificantes mediante PCR digital. El asterisco (*) hace referencia a la concentración obtenida para el gen *NxrB* de *Nitrospira* de una muestra adicional empleando las mismas condiciones analíticas.

De las bacterias nitrificantes clásicas se obtuvieron 15.044,55 copias/μL (sNOB + AOB en *Betaproteobacteria*). De la población de bacterias del licor mezcla, para el género *Nitrospira* (gen *NxrB*) se cuantificó la cantidad que equivaldría aproximadamente a la mitad del total de bacterias nitrificantes clásicas (Figura 4.69); estos resultados corroboran que el género *Nitrospira* es clave en los procesos de nitrificación que tienen lugar en el biorreactor.

En cuanto a la detección y cuantificación de *Nitrospira*, encontramos que prácticamente la totalidad de las NOB cuantificadas (gen *cynS*) pertenecerían a este género (gen *nxB*). Para la cuantificación del gen que codifica para la enzima *amoA* en *Nitrospira comammox*, resulta equiparable el resultado obtenido con las parejas de cebadores CA377f/C576r (específica para el clado A) y A189Y/C576r (gen *amoA* en *Nitrospira sensu lato*), pero no así como con la pareja CA209f/C576r (gen *amoA* en *Nitrospira sensu lato*), con la cual la cuantificación fue aproximadamente la mitad (Figura 4.69), predominando claramente la presencia del clado A respecto

del clado B, siendo la concentración del primero un orden de magnitud superior respecto del segundo. Estos resultados permitirían conocer mejor la proporción de las bacterias *comammox* y confirman que constituyen una parte relevante de la comunidad nitrificante en la EDAR Arroyo Valenoso.

Hay que destacar, por otro lado, que mediante esta técnica se ha podido cuantificar el gen que codifica para la enzima *amoA* en las arqueas amonio oxidantes, aunque la concentración ha sido muy baja (Figura 4.69), por lo que se considera más adecuado indicar que este grupo sólo ha sido detectado.

4.6.2.3. Mediante secuenciación masiva

Los resultados obtenidos a partir del análisis metataxonómico, realizado sobre la misma muestra empleada para el ensayo de *FISH* para bacterias nitrificantes, mostró que la presencia del Dominio *Archaea* (0,09%) es muy minoritaria respecto a *Bacteria* (99,91%). Se confirmó que las bacterias nitrificantes (Figura 4.70) están presentes, pero no representan un porcentaje elevado respecto al total de la población procariota. Entre las familias predominantes, destacan *Nitrospiraceae* y *Nitrosomonadaceae*, que presentó una proporción, respecto del total de familias, menor que la anterior.

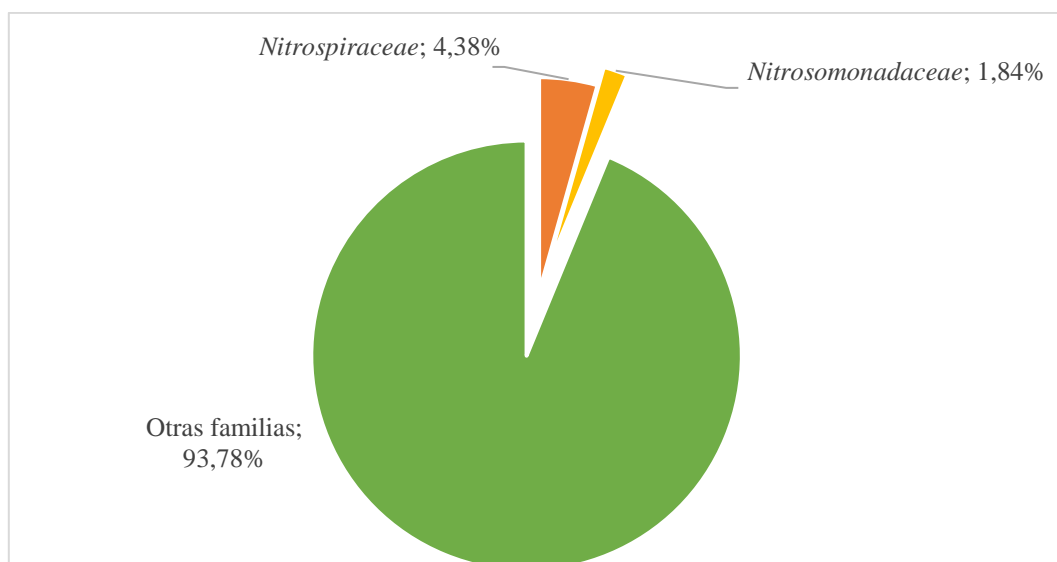


Figura 4.70: Proporción de las familias relacionadas con la nitrificación detectadas presentes en la EDAR Arroyo Valenoso cuantificadas mediante secuenciación masiva presentes en la cámara aeróbica.

A nivel taxonómico de género, *Nitrospira* supone una parte importante del total de géneros detectados (Figura 4.71). Otro género identificado y relacionado con la nitrificación fue *Nitrosomonas*, con una proporción menor que la del género *Nitrospira*.

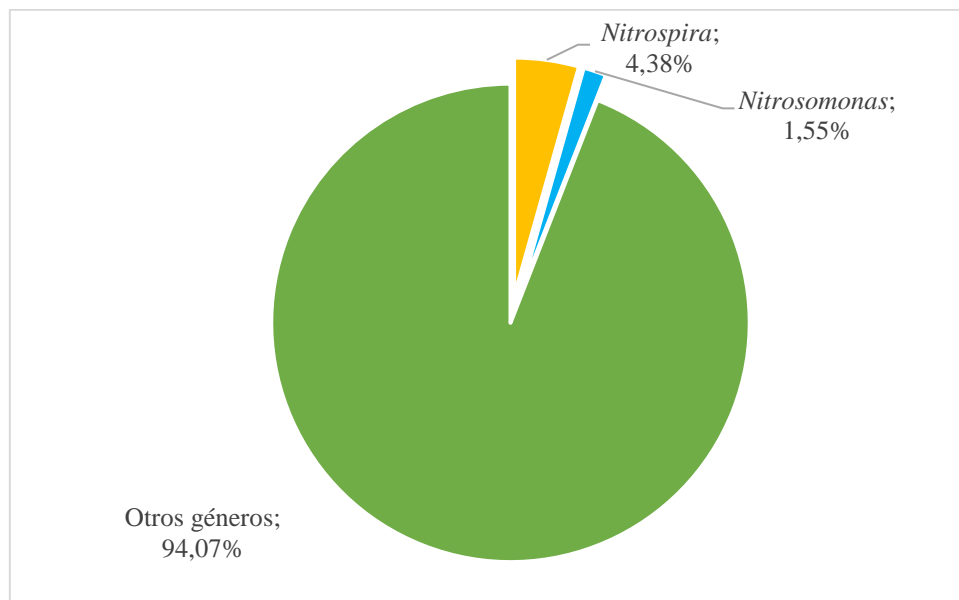


Figura 4.71: Proporción de los géneros relacionados con la nitrificación detectadas presentes en la EDAR Arroyo Valenoso cuantificadas mediante secuenciación masiva presentes en la cámara aeróbica.

A nivel de especie, Figura 4.72, destaca dentro del género *Nitrospira*, la especie *Nitrospira defluvii*; además fue posible identificar la presencia de *Nitrospira nitrosa* (una de las especies considerada *comammox*) y cuantificarla, siendo su proporción superior a un tercio de la proporción del género *Nitrospira* presente en la muestra analizada.

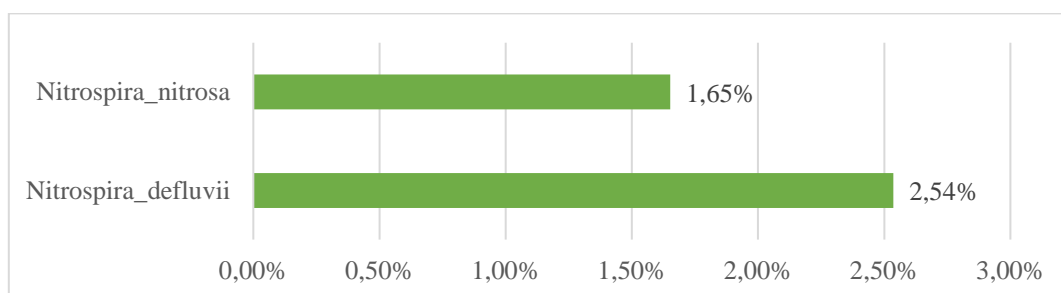


Figura 4.72: Proporción de especies del género *Nitrospira* presentes en la cámara aeróbica de la EDAR Arroyo Valenoso cuantificadas mediante secuenciación masiva.

4.7. Bioensuciamiento de las membranas del reactor MBR

4.7.1. Identificación de cepas bacterianas procedentes de los aislamientos

De los aislamientos realizados en los diferentes medios de cultivo (LB, VRBG y PSIA) se seleccionaron al azar diferentes colonias crecidas en las placas. Se eligieron siguiendo criterios de diferencias de color, morfología, rugosidad u otros caracteres macroscópicos, así como, posteriormente, de su resultado a la tinción de Gram realizada (Figura 4.73) y, de esta manera, se seleccionaron 114 cepas procedentes del licor mezcla y 12 de la biopelícula de la membrana.

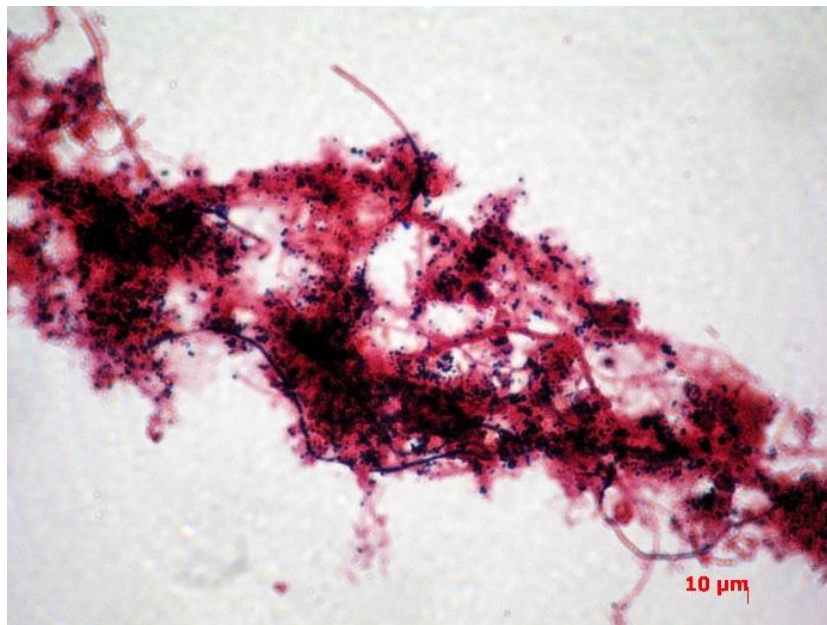


Figura 4.73: Respuesta a la tinción Gram de un flóculo procedente de la cámara anóxica, muestra AVM2.

Tras aislar y purificar las distintas cepas, extraer su material genético y llevar a cabo la amplificación mediante PCR de la región V1/V2 del gen ADNr 16S y la posterior purificación de los amplicones, se realizó una electroforesis en gel de agarosa para verificar la presencia del producto de PCR, el tamaño adecuado del amplicón y descartar posibles contaminaciones (Figura 4.74).

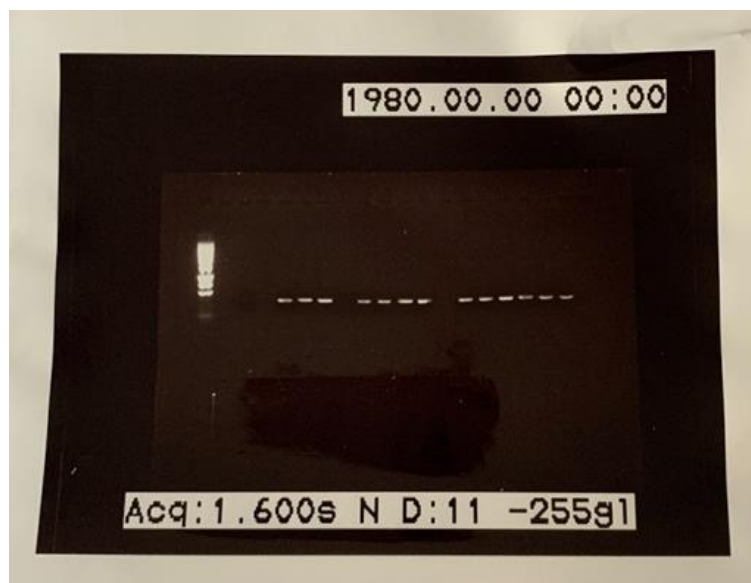


Figura 4.74: Fotografía del gel de electroforesis realizado tras la purificación de los amplicones de las cepas de la colección 95,97,98,99,100,101,102,104,105,106,107,108 y 110.

En el gel de electroforesis se cargaron los diferentes analitos como se muestra en la Tabla 4.20: PM representa al patrón de masas, las X son pocillos vacíos, CN el control negativo y los números corresponden a las cepas ensayadas de la colección.

Pocillo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Analito	PM	X	CN	X	95	97	98	99	100	101	102	X	X	104	105	106	107	108	110	X

Tabla 4.20: Esquema de la distribución de los diferentes elementos incluido en una de las electroforesis realizadas durante este trabajo.

En la Tabla 8.36 del Anexo se muestran las cepas identificadas procedentes del licor mezcla, que se etiquetaron (procedencia: EDAR Arroyo Valenoso) y se conservaron a -80°C añadiéndose a la colección de cultivos microbianos perteneciente al Grupo de Investigación 910672 Ecología y Biotecnología Microbianas de la UCM. Asimismo, se indica el número de acceso correspondiente en la base de datos del NCBI. Los géneros bacterianos más representados, entre las cepas seleccionadas, fueron *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* y *Acinetobacter*; identificándose también cepas pertenecientes a los géneros *Escherichia* y *Klebsiella*.

En la Tabla 4.21 se especifican los datos relativos a la identificación de las cepas aisladas procedentes del raspado de las membranas ubicadas en el compartimento MBR, éstas también se sumaron a la colección de cultivos microbianos del grupo de investigación.

Cepa	Identificación completa	Entrada
1	*	*
2	<i>Pseudomonas sp</i>	CP045118.1; CP043626.1
3	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	KF720717.1
4	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	KF720717.1
5	<i>no cultivada</i>	LR634576.1
6	<i>no cultivada</i>	LR638448.1 (LT677824.1)
7	<i>Aeromonas hydrophila/sp</i>	MT605959.1
8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MH680832.1
9	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	CP040439.1; EF511568.1
10	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KF720732.1
11	<i>no cultivada: Acinetobacter sp.</i>	KC514127.1; KX817287.1
12	<i>no cultivada: Microbacterium</i>	LR637590.1; HQ183912.1

Tabla 4.21: Identificación de las cepas procedentes del raspado de las membranas del reactor MBR y su código correspondiente en la base de datos del NCBI. El asterisco (*) indica que es una cepa sin identificar.

La cepa 6 consta en la base de datos del NCBI como no cultivada, sin embargo, podría tratarse de una Betaproteobacteria perteneciente a la familia *Neisseriaceae* al coincidir en porcentaje de cobertura e identidad con otras entradas de la misma base de datos.

4.7.2. Producción de autoinductores: acil homoserin lactonas

Estas últimas cepas procedentes del raspado de la membrana del biorreactor fueron las empleadas para ensayar su posible producción de AHL, que se observará por su capacidad de inducir la síntesis de violaceína en las cepas biosensoras CV026 y VIR07. Se descartaron para este estudio tanto la cepa 1 que no se consiguió identificar, como la cepa 8, *Klebsiella pneumoniae*, por estar descrita como patógeno humano, y evitar así posibles riesgos de infección. Los resultados obtenidos para el resto de las cepas analizadas se muestran en la Tabla 4.22, en la que se indica con un signo (+) o un signo (-) si se detectó o no el pigmento violeta tras la incubación conjunta de cepas problema y cepas biosensoras.

Cepa	CV026 (C6)	Vir07 (C12)
<i>Pseudomonas sp</i>	-	-
<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	-	-
<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	-	-
no cultivada	-	-
no cultivada	-	-
<i>Aeromonas sp</i>	+	Ligera coloración positiva
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	+	-
<i>Acinetobacter sp.</i>	-	-
<i>Microbacterium</i>	-	-

Tabla 4.22: Resultados del ensayo realizado para la detección de la producción de autoinductores (AHL). El signo (+) indica que se observa producción de violaceína por parte de la cepa biosensora y el signo (-) que no se observa producción de violaceína.

En la Figura 4.75 se muestra un ejemplo del ensayo realizado: placas conteniendo el medio de cultivo LB con las cepas 6, 7 y 10 crecidas en la proximidad de las dos cepas biosensoras Vir07 y CV026, y se observa la producción de violaceína inducida en la cepa biosensora CV026 por las cepas 7 (esquina inferior izquierda) y 10 (esquina superior izquierda).

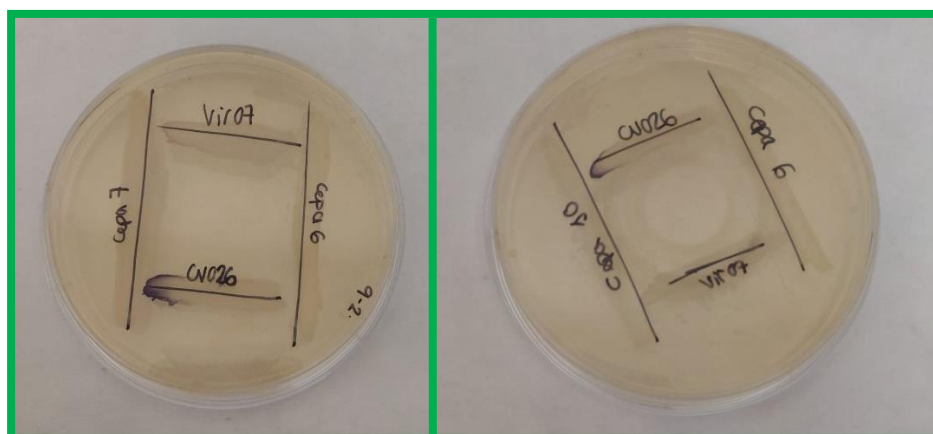


Figura 4.75: Cepas 6, 7 (izquierda) y cepas 6 y 10 (derecha) incubadas junto con las cepas biosensoras CV026 y VIR07.

4.7.3. Capacidad de colonización de superficies: ensayo de adhesión celular

En el ensayo de adhesión celular se obtuvo un valor de absorbancia para el control negativo de 0,0546. Teniendo en cuenta este resultado, el criterio para clasificar las diferentes categorías de capacidad de adherencia (en las condiciones ensayadas), es el que se muestra en la Tabla 4.23.

Cepas bacterianas	Absorbancia
No adherente	<0,0546
Débilmente adherente	0,0546-0,1092
Moderadamente adherente	0,1092-0,2184
Fuertemente adherente	>0,2184

Tabla 4.23: Clasificación de cepas según su capacidad de adherencia a la superficie ensayada conforme al valor de blanco obtenido.

Conforme a este criterio se obtuvo, en promedio: las cepas de *Pseudoxanthomonas mexicana* (cepas 3 y 4), la cepa 5 (sin identificar) y *Aeromonas hydrophila*/sp (cepa 7) se clasifican como débilmente adherentes, puesto que los valores de absorbancia obtenidos fueron de $0,0974 \pm 0,0103$; $0,0578 \pm 0,0051$; $0,0713 \pm 0,0041$ y $0,1084 \pm 0,0215$ respectivamente. *Pseudomonas* sp (cepa 2) que mostró una absorbancia de $0,1332 \pm 0,0346$ y *Aeromonas hydrophila* (cepa 10) con una absorbancia de $0,1934 \pm 0,0995$ son moderadamente adherentes. Por último, las cepas “fuertemente adherentes” fueron la cepa 6 (no cultivada, absorbancia: $1,3848 \pm 0,0414$), *Stenotrophomonas maltophilia* (cepa 9, absorbancia: $0,6571 \pm 0,025$), *Acinetobacter* sp (cepa 11, absorbancia: $0,2321 \pm 0,1404$) y *Microbacterium* sp (cepa 12, absorbancia: $0,6146 \pm 0,2483$).

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. Depuración de las aguas residuales: Tecnología y diseño de la EDAR Arroyo Valenoso

La creciente preocupación de la sociedad por la contaminación de ríos y lagos ha derivado en regulaciones internacionales y gubernamentales cada vez más estrictas, lo que se ha traducido en un notable aumento de las obras realizadas en las instalaciones destinadas a la mejora del tratamiento de las aguas residuales (für Wasserwirtschaft, 1999; Ganner et al., 2002).

Cuando se diseña una EDAR, se recaba información sobre demografía, pluviometría, expansión urbanística y otros muchos aspectos lo que permite que, tras la ejecución de la obra y la puesta en marcha de la planta, se alcancen los objetivos de depuración y rendimiento de la instalación además de los requisitos que se establecen en la legislación vigente (consultar Tabla 8.3 del Anexo). Se ha tenido la oportunidad de estudiar la planta de Arroyo Valenoso prácticamente desde su puesta en funcionamiento. Además de depurar las aguas del municipio madrileño de Boadilla del Monte, con el agua depurada y regenerada de esta EDAR se pretende reestablecer el entorno natural del arroyo del mismo nombre al que son vertidas estas aguas, recuperando el caudal ecológico que permitirá reestablecer el ecosistema. El proceso de depuración se inició en octubre de 2016 al inocular conjuntamente en el biorreactor, 150 m³ procedentes de una EDAR cercana y 200 m³ de una EDAR compacta que se había instalado provisionalmente en la ubicación actual de la planta.

Las EDAR son una de las aplicaciones biotecnológicas más utilizadas en el mundo (Xia et al., 2010) y forman parte de infraestructuras vitales para las sociedades urbanas modernas (Grant et al., 2012). Durante algún tiempo desde la implantación de estos procesos, fue difícil conseguir efluentes de alta calidad y aun actualmente es relativamente frecuente que ocurran alteraciones en el rendimiento (Dionisi et al., 2003); no obstante, en los últimos años se han introducido mejoras importantes como la compartimentalización del reactor biológico o la implementación a gran escala del sistema MBR, del que ya disponen entre el 10% y el 25% de las instalaciones a nivel mundial (Bluegold, 2020). La tecnología MBR, que integra la eliminación de materia orgánica y de nutrientes por fangos activos y la filtración por membranas en un solo sistema, ha atraído una gran atención en las últimas décadas (Kraume & Drews, 2010; Mutamim

et al., 2013), considerándose una de las innovaciones más importantes en el tratamiento de aguas residuales de los últimos tiempos (Iorhemen et al., 2016).

Hay que destacar que la EDAR investigada es la primera instalación en la Comunidad de Madrid dotada de tecnología MBR en el tratamiento secundario, junto con compartimentos anóxico y aeróbico que están totalmente cubiertos. Toda la instalación está, además, en el interior de una nave industrial, por lo que este estudio puede resultar de gran interés para la entidad gestora del ciclo del agua de dicha Comunidad Autónoma puesto que aclara aspectos fundamentales del funcionamiento de este tipo de instalaciones.

Los datos recogidos a lo largo de este estudio confirman un correcto funcionamiento, así como el cumplimiento de los objetivos tanto de diseño como los de calidad legalmente establecidos para esta instalación. Los rendimientos promedio para los parámetros recogidos en la legislación fueron: SST 99%, DQO 93%, DBO₅ 99%, NT 73% y PT 76%; este último parámetro no cumple el porcentaje de reducción conforme a lo establecido en el RD 509/1996, pero sí cumple en lo que respecta a la concentración presente en el agua vertida al cauce receptor (efluente), tal y como exige ese mismo Real Decreto. Estos resultados demuestran una elevada estabilidad y eficiencia de depuración en la EDAR Arroyo Valenoso. Es importante señalar que, como se demuestra en este trabajo, la planta tiene capacidad amortiguadora suficiente para afrontar cambios en las avenidas de influente sin menoscabo de su funcionamiento y rendimiento como cuando, por ejemplo, se recibieron caudales muy elevados (en el muestreo 13 se alcanzaron valores que doblaban lo habitual) o cuando éstos presentaron valores de DQO tan altos como los 5.556 mg/L detectados en el quinto muestreo.

Entre las características operacionales que presentan las instalaciones con este tipo de tecnología se encuentran los altos valores de TRC, las elevadas concentraciones de SSLM y la baja relación nutrientes-microorganismos (F/M, del inglés *food/microorganism*) (Li et al., 2010). Los tres parámetros fueron evaluados en Arroyo Valenoso mostrando los dos primeros valores promedio de 76,33 días y de 3.517,03 mg/L; que pueden considerarse idóneos también para la eliminación de nitrógeno (Judd, 2011; Li et al., 2010).

Durante el proceso de la depuración, la cantidad de nutrientes disponibles en el agua residual puede alcanzar valores limitantes para la actividad bacteriana y su crecimiento, e incluso provocar la pérdida de viabilidad celular. La velocidad de crecimiento depende de la

cantidad de nutrientes disponibles para los microorganismos presentes en el biorreactor, este equilibrio F/M es importante y se relaciona bien con la velocidad de crecimiento de los microorganismos (Siqueira-Castro et al., 2016). Durante el tratamiento del agua residual se regula ese factor, denominado carga másica, para asegurar que el sistema se alimente a la misma velocidad a la que los microorganismos sean capaces de degradar los contaminantes (nutrientes). El rango típico de F/M para sistemas de aireación prolongada, como el de la instalación estudiada en este trabajo, se establece entre 0,05 y 0,10 kg DBO₅/kg SSVLM x día (Buitrón Méndez et al., 2018) en contraposición a los sistemas de depuración de aguas residuales urbanas de aireación convencional, para los que el rango de F/M se establece entre 0,15 y 0,45 kg DBO₅/kg SSLM x día (Ramírez, 2004).

A pesar de sus muchas ventajas, el ensuciamiento de las membranas es un inconveniente crítico en los MBR, lo que limita una implementación más amplia de esta tecnología (Hwang et al., 2012). Entre los tipos de ensuciamiento que existen, el bioensuciamiento está causado por la deposición de microorganismos y productos microbianos en la superficie de la membrana (Luo et al., 2014; Ramesh et al., 2007), como ya se ha comentado en la Introducción. En este proceso, los microorganismos se adhieren y crecen formando una biopelícula en la membrana, obstruyendo los poros de la misma y aumentando así la presión requerida para el filtrado, la presión transmembrana (PTM), lo que finalmente afectará al rendimiento del MBR (de Celis et al., 2021; Ivnitsky et al., 2007) reduciendo la producción de efluente y la vida útil del módulo de membranas y aumentando los costes de operación y mantenimiento (Zhou & Smith, 2001). Existen diferentes configuraciones de los módulos MBR; la EDAR estudiada tiene instalados módulos de fibras huecas verticales (Chang & Judd, 2002; Chang et al., 2002; Le-Clech et al., 2003) que, además de ser más baratos de fabricar, permiten una alta densidad de membrana y pueden tolerar un lavado a contracorriente vigoroso, dado que las fibras huecas son más propensas al ensuciamiento y requieren un lavado y una limpieza más frecuentes (Chang et al., 2002). En la EDAR Arroyo Valenoso tienen establecida una programación de lavado de membranas consistente en un lavado semanal de cada módulo de membranas con hipoclorito sódico y, semestralmente, una limpieza de recuperación con hipoclorito sódico y ácido cítrico, además de una revisión anual de los elementos de control del sistema de ultrafiltración. Sin embargo, dadas las características del fango y al no observarse pérdidas de PTM, el mantenimiento semestral cambiará su periodicidad a anual.

El alcance de este trabajo no incluyó el estudio de pérdidas de PTM o el análisis del cambio en los costes de operación en el módulo de membranas, no obstante, durante todo el estudio, se consultó a los responsables de la explotación si habían observado algún cambio en la capacidad de filtración y nunca refirieron alteraciones o incidentes, por lo que se podría inferir que el sistema no habría colapsado y/o que en el tiempo transcurrido entre el inicio y el final del periodo de muestreo no se detectaron pérdidas de eficiencia de filtración. Hay que comentar que para reducir o mitigar el ensuciamiento de las membranas, incluido el bioensuciamiento, se varía tanto el TRC como la concentración de SSLM. Los primeros sistemas MBR operaban con tiempos de TRC de hasta 100 días y SSLM de hasta 30 g/L, actualmente, para simplificar el mantenimiento y la limpieza de las membranas, se tiende a aplicar un TRC más bajo (10-20 días) y concentraciones de SSLM también menores (10–15 g/L) (Chang et al., 2002). Hay que destacar que la estrategia de operación realizada en la EDAR estudiada es una mezcla de ambas opciones dado que, conforme con lo reflejado previamente, el TRC promedio fue bastante alto (76,33 días) y la concentración de SSLM muy baja (3,52 g/L).

5.2. Ecología del fango activo en biorreactores con sistemas MBR

Durante la depuración de las aguas residuales tienen lugar distintas reacciones metabólicas que contribuyen a eliminar o transformar la materia orgánica, los nutrientes y muchos otros contaminantes tales como sulfuros y metales, entre otros. Estas reacciones pueden realizarse tanto en condiciones aerobias (presencia de oxígeno disuelto, OD), como anóxicas (ausencia de OD, presencia de nitratos) o anaerobias (ausencia de OD y nitratos); la especificación de lo que implica cada una de ellas se ha realizado según la terminología utilizada en el sector (Knobelsdorf, 2005). El sistema de fangos activos se comenzó a utilizar hace más de 100 años (Arden & Lockett, 1914) principalmente para la eliminación de materia orgánica y de nutrientes (nitrógeno y fósforo) del agua residual, de forma que los microorganismos convierten la materia orgánica y los nutrientes en compuestos más simples y nueva biomasa (Knobelsdorf, 2005). Respecto a los nutrientes, en la EDAR Arroyo Valenoso únicamente la eliminación de nitrógeno tiene lugar mediante procesos metabólicos microbianos, ya que el fósforo es eliminado mediante tratamiento químico por adición de cloruro férrico al finalizar el tratamiento secundario.

5.2.1. *El flóculo*

La mayor parte de la biomasa se organiza en flóculos, agregados constituidos por bacterias y otros organismos que quedan embebidos en una matriz exopolimérica (Arregui et al., 2013; Jenkins et al., 2003). El estudio macroscópico y microscópico de los flóculos y la caracterización de los microorganismos presentes, permiten evaluar la calidad del fango activo y, de este modo, conocer cómo se está produciendo la depuración en una EDAR (Rodríguez et al., 2008).

La estructura de los flóculos puede ser muy heterogénea y dependerá del tipo de proceso llevado a cabo en la instalación y de la composición de las aguas residuales a tratar (Wilén et al., 2003). Su tamaño y morfología es variable (Liao et al., 2001; Wilén et al., 2003) y son propiedades que tienen una influencia importante en la sedimentabilidad del fango (Eriksson & Alm, 1991; Urbain et al., 1992). Se han estudiado distintas características del fango activo muestreado siguiendo las indicaciones especificadas para el cálculo del Índice de Fango (IF) (Le-Clech et al., 2006; Rodríguez et al., 2008). El tamaño de los flóculos es uno de los parámetros microscópicos a determinar mostrando valores que han variado en los tres compartimentos estudiados entre 10 μm y 1 mm, se observó que el tamaño promedio estaba entre los 150 y 500 μm , que se corresponde con un tamaño medio, aunque en otros estudios se ha determinado que el tamaño del flóculo en instalaciones con sistemas MBR puede ser bastante menor, mostrando valores promedio de 25 μm (Bae & Tak, 2005; Jenkins et al., 2003). La sedimentabilidad, medida durante el ensayo de la V30, forma parte de las características macroscópicas del IF. Para las cámaras anóxica y aeróbica la sedimentabilidad observada osciló entre los 800 y los 300 mL de fango decantado, y para el reactor MBR fue superior a 800 mL, clasificándola como media en el primer caso y baja en el segundo. Una sedimentabilidad baja en el último compartimento del biorreactor está asociada a problemas en la sedimentación del fango y, por tanto, a una deficiente separación de éste respecto del agua depurada, obteniéndose efluentes de menor calidad; no obstante, los valores observados para este parámetro, al igual que el calculado para el IF en su conjunto, no resultan tan relevantes en instalaciones MBR puesto que la separación del agua depurada del fango se realiza por filtración y parámetros como la sedimentabilidad no sólo no influyen en la calidad final del efluente, sino que éste puede ser, además, de mayor calidad y más fácilmente reutilizable (Iorhemen et al., 2016; Le-Clech, 2010).

Existen numerosos trabajos en los que se han estudiado y analizado los flóculos, sus características y su implicación en la calidad del efluente, a partir de diferentes índices. En este sentido, mencionar el índice de Madoni (Madoni, 1994), el índice de diversidad de Shannon (Shannon & Weaver, 1949) o el índice de Fango (Rodríguez et al., 2008), todos ellos contemplados en uno u otro contexto durante el desarrollo de este trabajo. Cabe destacar que existen trabajos interlaboratorios en los que se evaluó positivamente la aplicabilidad directa del IF por los operadores de las EDAR (Arregui et al., 2012; Rodríguez et al., 2008). En la EDAR estudiada, el cálculo se ha realizado en los tres compartimentos del biorreactor comprobándose que, como era previsible, la calidad del fango era buena salvo en el MBR, descrita como regular, aspecto que ya se ha comentado anteriormente.

5.2.2. Las comunidades microbianas del fango activo

Los microorganismos presentes en los tratamientos biológicos de las EDAR degradan una amplia gama de compuestos (Cyzdik-Kwiatkowska & Zielińska, 2016), siendo fundamentales para la depuración del agua, si bien es cierto que su diversidad y los factores que la controlan son poco conocidos (Wu et al., 2019). Cambios en la diversidad, ya sea en el número de especies, en la distribución o en su abundancia o dominancia, pueden utilizarse como sistemas de alerta de un deterioro del proceso de depuración (Magurran, 1988). Resulta indicado determinar tanto valores de riqueza y abundancia como aplicar índices biológicos calculados a partir de la estructura de la comunidad, de tal forma que se obtiene una información complementaria con ambos parámetros en la descripción de la diversidad (Moreno, 2001) por lo que, en este trabajo, se consideraron ambas aproximaciones. Para el análisis de la comunidad de protistas y micrometazoos se utilizaron índices de diversidad tales como el de Shannon o Simpson, mientras que se empleó la serie de Hill en el caso de la comunidad procariota (bacterias y arqueas), más simples en su aplicación e interpretación puesto que mide la diversidad en número de especies y no en bits (Peet, 1974), además, la escala de este índice es mayor y se aprecian mejor los cambios en la diversidad.

5.2.2.1. *Los protistas y micrometazoos*

No en todas las EDAR se monitorizan regularmente las poblaciones de protistas y micrometazoos y la razón principal fue sintetizada por Kinner y Curds en un trabajo referido a la búsqueda de protistas bioindicadores (Kinner & Curds, 1987): “*todas las estrategias de indicadores adolecen de un dilema común: simplificar la taxonomía compleja requerida para identificar protistas y metazoos a un nivel utilizable por los operadores de plantas de tratamiento de aguas residuales sin sacrificar distinciones importantes entre géneros y especies*”, lo cual fue corroborado con los resultados de estudios interlaboratorios en los que se comprobó que la identificación de estos organismos mostraba niveles bajos de concordancia entre los participantes (Arregui et al., 2012). A pesar de las dificultades, se ha defendido ampliamente el uso de estos microorganismos de los fangos activos para evaluar las condiciones operativas de las EDAR con tratamientos biológicos (Madoni, 1994; Nicolau et al., 2001; Puigagut et al., 2005; Salvadó et al., 2004).

Los protistas intervienen en el proceso de eliminación de materia orgánica, controlan la densidad de bacterias a través de la depredación y contribuyen al proceso de floculación, además, pueden considerarse como indicadores de una buena calidad del efluente y de la eficiencia del proceso (Arregui et al., 2008; Madoni, 2003, 2011; Martín-Cereceda et al., 1996; Tocchi et al., 2012; Zhou et al., 2006). La composición y estructura de las comunidades de estos microorganismos proporcionan herramientas poderosas para la determinación del impacto de la contaminación en la calidad biológica de los ecosistemas (Pawlowski et al., 2016). Es muy probable que haya ciertas especies de protistas no descritas en las plantas de fangos activos, bien porque pertenezcan a la denominada “biosfera rara” (Weisse, 2014) o porque no se presenten en estos sistemas en densidades apreciables (Foissner, 2016). Los protistas pueden servir como una herramienta de alerta temprana y/o tardía para detectar cuando el cauce al que se vierte el agua ya depurada muestra signos de sobrecarga y, por lo tanto, de un posible deterioro (Berger et al., 1997; Curds, 1992; Ganner et al., 2002; Liebmann, 1936, 1951; Uhlmann, 1982).

5.2.2.1.1. Estructura y dinámica de la población eucariota

Los protistas son, junto con las bacterias, los grupos de microorganismos más abundantes e importantes dentro de la comunidad de los fangos activos, llegando a alcanzar concentraciones medias en el tanque de aireación de 5×10^4 individuos/mL (Fernández-Galiano et al., 1996) e incluso superiores como los 10^4 - 10^6 individuos/mL referidos en otros trabajos (Madoni, 1988; Pérez-Uz et al., 2010; Serrano et al., 2008). En este estudio se observó una abundancia promedio para los tres compartimentos de $5,28 \times 10^4$ individuos/mL, estos datos concuerdan con dichos estudios y parecen indicar que, como también se ha señalado en otras instalaciones de tipo MBR, donde el valor referido fue de $3,1 \times 10^3$ individuos/mL (Liébana et al., 2015), la abundancia de protistas en este tipo de depuradoras se encontraría en un rango bajo de densidad respecto a depuradoras convencionales. Además, un dato complementario es que en esta EDAR, con varios compartimentos diferentes, parecen producirse pocas variaciones de abundancia entre los mismos ($5,34 \times 10^4$, $4,98 \times 10^4$ y $5,52 \times 10^4$ individuos/mL para las cámaras anóxica, aeróbica y el reactor MBR respectivamente), lo que denota una alta estabilidad de la comunidad de estos microorganismos en el sistema. En cuanto a los micrometazoos se refiere, estos parecen comunes en las muestras de fangos activos oscilando, por lo general, su abundancia entre 0 y 10^2 ind/mL (Arregui et al., 2013), sin embargo, los resultados de este estudio presentaron valores más elevados en todos los compartimentos ($9,00 \times 10^2$, $1,28 \times 10^3$ y $1,36 \times 10^3$ individuos/mL, en los compartimentos anóxico, aeróbico y MBR respectivamente), lo cual se suele asociar a una alta edad de fango (Rodríguez et al., 2008), que es una característica de esta instalación, como ya se ha comentado en el apartado anterior.

En cuanto a la riqueza de taxones identificados, la de este estudio resultó ser más alta que la indicada en trabajos anteriores, como el de Martín-Cereceda y colaboradores (Martín-Cereceda et al., 1996) en el que se identificaron, únicamente en la cámara aeróbica, 23 especies diferentes en el total de las 10 EDAR estudiadas frente a los 29 taxones identificados en las cámaras anóxica y aeróbica y los 27 taxones identificados en el reactor MBR, lo que está más en concordancia con los valores obtenidos por otros autores (36-60) (Madoni & Sartore, 2003; Pérez-Uz et al., 2010). Se debe considerar en este punto, que tanto la tecnología como las condiciones de operación empleadas no son las mismas en las diferentes instalaciones investigadas aunque en todas se consideraron procesos de depuración mediante fangos activos; además, en este trabajo se tuvieron en cuenta los diferentes compartimentos del biorreactor

mientras que en los otros estudios mencionados la riqueza se contempló únicamente en la cámara aireada. Adicionalmente, se detectaron dos grupos de micrometazoos tanto en las cámaras anóxica y aeróbica como en el reactor MBR. Rotíferos y nemátodos no se incluyeron en el estudio de organismos eucariotas de los trabajos referidos anteriormente, aunque sí se mencionaron en otros como el de Foissner (2016) en el que se indica una frecuencia y abundancia similares a las observadas en este trabajo.

En relación a la proporción relativa de los diferentes grupos de protistas, divididos de acuerdo a los criterios establecidos por Madoni en flagelados, amebas y ciliados (Madoni, 1994, 2003; Pérez-Uz et al., 2010), el grupo dominante fue el de los ciliados, como ya se había descrito anteriormente en el tanque aeróbico de los sistemas convencionales (Arregui et al., 2010; Madoni, 1988, 1994; Serrano et al., 2008) en el que estos microorganismos representaban una media del 71,50% de la abundancia total de protistas y micrometazoos, o en un sistema MBR con una abundancia del 77% (Liébana et al., 2015), valores muy semejantes a los obtenidos en la EDAR estudiada: 70,03 %, 69,35% y 75,11% en las cámaras anóxica, aeróbica y en el reactor MBR respectivamente. Estos resultados podrían indicar que la dominancia de este grupo sería independiente del tipo de tecnología de separación del fango que tenga implementada la instalación.

A continuación, el grupo de las amebas, consideradas en su conjunto (desnudas y testáceas), presentó una abundancia media del 18,29% (20,90% y 19,90% en las cámaras anóxica y aeróbica y 14,08% en el reactor MBR), porcentaje algo superior al descrito por Liébana y colaboradores (Liébana et al., 2015), quienes reportaron el 17% en un sistema MBR y claramente mayor al 11% descrito por Pérez-Uz y colaboradores (Pérez-Uz et al., 2010). Los flagelados (incluyendo pequeños y grandes flagelados) son más abundantes en el sistema MBR tal y como afirman Pérez-Uz y colaboradores (2010). Liébana y colaboradores (2015) y Arregui y colaboradores (2012) indican que los flagelados, junto a las amebas, serían poco relevantes en sistemas convencionales de fangos activos, exceptuando aquellas plantas altamente cargadas durante las etapas de arranque o sobrecarga temporal.

La mayoría de los protistas comunes en ecosistemas naturales aparecen en los fangos activos, pero también hay especies menos comunes o poco conocidas que han sido más difíciles de identificar, como puede ser el caso de *Metacystis* (Foissner, 2016), un ciliado protostomado que no se consideraba común en las plantas y que posteriormente fue adecuadamente descrito

y ubicado taxonómicamente (Arregui et al., 2010), este género se ha observado también en esta EDAR. La identificación de especies basada en caracteres morfológicos generalmente exige mucho tiempo y requiere una excelente formación taxonómica (poco frecuente entre los operadores de las EDAR) para la realización de recuentos correctos de las densidades de protistas y de identificaciones precisas de los géneros y de las especies de protistas presentes en los biorreactores (Arregui et al., 2013). De este modo, las especies identificadas correctamente son, con una alta probabilidad, aquellas que presentan densidades moderadas o altas, rasgos morfológicos claramente reconocibles o especies comúnmente detectadas en este tipo de ecosistema, como, por ejemplo, *Arcella* sp, *Acineria* sp., *Aspidisca* sp, *Epistylis* sp o *Vorticella convallaria*, muy comunes en el reactor biológico de las EDAR y cuyas características morfológicas permiten su fácil identificación (Arregui et al., 2012; Arregui et al., 2009; Dubber & Gray, 2009; Martín-Cereceda et al., 1996). Todos estos géneros han sido observados en los tres compartimentos del biorreactor analizados y, pese a pequeñas variaciones en abundancia (véase en el Capítulo 4. Resultados, el apartado 4.3.2.), estas especies han presentado generalmente abundancias muy elevadas; además habría que añadir a *Bodo saltans* o *Trochilia minuta*, considerados como altamente representativos en otros estudios (Arregui et al., 2009; Pérez-Uz et al., 2010). Sin embargo, bajas densidades, tamaños pequeños, organismos coloniales con gran número de individuos o características morfológicas poco reseñables dificultan la identificación de ciertas especies de protistas (Arregui et al., 2012), como en el caso de *Acineta* u *Opercularia*, reflejadas como muy poco abundantes en Arroyo Valenoso o el de *Tokophrya* o *Entosiphon* cuya identificación sólo alcanzó el nivel taxonómico de género.

El estudio de la diversidad de la comunidad de protistas y micrometazoos realizado de manera conjunta y para cada uno de los compartimentos del biorreactor, se ha abordado desde dos puntos de vista: el primero, entendiendo la diversidad como riqueza de taxones y teniendo en cuenta los diferentes grupos de protistas; el segundo, como diversidad estructural, mediante el cálculo de los índices de Shannon-Weaver (Shannon & Weaver, 1949), un índice biológico fácil de interpretar y que además proporciona una información adecuada de “control” de la comunidad (Rodríguez et al., 2008), el índice de Simpson (Simpson, 1949) y el índice de la uniformidad (Hayek & Buzas, 1997).

En este trabajo se ha correlacionado la estacionalidad y los factores abióticos estudiados utilizando los análisis multivariantes NMDS y CCA, un tipo de aproximación utilizada para el estudio de las comunidades bacterianas por otros autores (Akinwole et al., 2021; de Celis et al.,

2020; de Celis et al., 2022; Kalinowska et al., 2022) y utilizada, en este caso, sobre la comunidad de protistas y micrometazoos. De los resultados del análisis NMDS, se puede inferir que, en las cámaras anóxica y aeróbica, la comunidad de protistas en la primavera y el otoño serían diferentes al igual que en el verano y el invierno, por lo que habría una clara diferenciación entre estaciones frías y cálidas. En el reactor MBR, la comunidad de protistas y micrometazoos sería diferente en otoño y verano y más parecida entre el invierno y la primavera. Estos resultados son contrarios a la hipótesis de partida en la que, debido a las características de la instalación (reactores cubiertos y en el interior de un edificio), se pensó que habría una menor variación de la temperatura del licor mezcla, si bien las variaciones de otros parámetros fisicoquímicos y/u operacionales analizados pudieron dar lugar a esos cambios poblacionales.

Respecto a las relaciones entre las poblaciones de protistas y micrometazoos con los parámetros ambientales, destacaremos que algunas especies como *Plagiocampa* sp alcanzaron abundancias elevadas cuando ciertos compuestos nitrogenados y determinados parámetros relacionados con la materia orgánica presentaron valores más elevados (por ejemplo $N-NH_4^+$, $N-NO_3^-$, NT, DQO y/o DBO_5); también aumenta la densidad del ciliado *Plagiopyla* sp en diferentes estaciones con valores altos de $N-NH_4^+$, $N-NO_2^-$, $N-NO_3^-$ y/o NT, además de DQO y DBO_5 en las estaciones más cálidas. Otros ciliados como *Aspidisca lynceus* o *Epistylis* spp disminuyeron su abundancia cuando en el efluente se encontraron valores más altos de amonio o nitritos, así como cuando aumentó el tiempo de retención celular o los SSLM en el reactor.

5.2.2.1.2. Los protistas y micrometazoos como bioindicadores

Según propusieron Spanh y Sherry (Spahn & Sherry, 1999), los bioindicadores ambientales son todos aquellos organismos vivos que gracias a sus características, cuentan con una elevada sensibilidad a los diferentes cambios ambientales que se producen en la naturaleza, reaccionando frente a ellos como si de estímulos específicos se trataran, y reaccionando ante la presencia de contaminantes mucho antes que los indicadores artificiales o abióticos.

Varios autores han destacado la importancia como bioindicadores del grupo de los pequeños flagelados que han sido relacionados con la alta carga de compuestos orgánicos y nitrogenados (Drzewicki & Kulikowska, 2011), la adecuada calidad del efluente (dos Santos et al., 2014) o buenas tasas de nitrificación (Pérez-Uz et al., 2010). En este estudio se ha identificado una correlación significativa entre la abundancia de *Bodo saltans* y varios de los parámetros

fisicoquímicos analizados como el pH en el influente y el compartimento anóxico, en los que elevadas abundancias se relacionan significativamente con valores inferiores a 7,7 Ud, por lo que podrían utilizarse como indicador de una tendencia al descenso del pH. Por otro lado, la alta densidad de este flagelado indicaría un aumento de la turbidez. Con respecto a los nutrientes la elevada abundancia de *Bodo saltans* se relaciona con bajas concentraciones de N-NO₃⁻, TON, NKjeldahl y NT y de PT, por lo que esta especie podría indicar una baja carga de nutrientes en el reactor.

Del grupo de los grandes flagelados, Parada-Albarracín y colaboradores (Parada-Albarracín et al., 2017) señalaron a *Peranema* como bioindicador del proceso de nitrificación y de un correcto funcionamiento del proceso de depuración en los sistemas MBR. En este trabajo se ha detectado una correlación significativa de ese flagelado con los compuestos de nitrógeno N-NH₄⁺ y N-NO₂⁻, claves en el proceso de nitrificación, tal y como describieron también Akpo y Momba (Akpor & Momba, 2010). Además, se propone a *Entosiphon* sp como bioindicador del proceso de eliminación de nitrógeno al presentar correlación positiva con los compuestos de nitrógeno N-NO₃⁻ y TON; en trabajos anteriores este protista se reveló como un buen indicador de baja carga másica (Rodríguez et al., 2008).

Con respecto al grupo de las amebas, se identificaron como indicadoras las amebas desnudas de tamaño entre 20 y 50 micras, ya que su abundancia se correlacionó significativamente con el Nkjeldahl, el NT y el PT además de con el TRH, presentando también correlación significativa con *Entosiphon* sp; por lo que ambos, tanto individualmente como juntos, suponen un indicador potente de la correcta eliminación de nutrientes. De las amebas testáceas, *Arcella* sp presentó correlación significativa con la concentración de N-NO₂⁻ y con la temperatura además de con el TRC, coincidiendo con lo descrito previamente para este género por Rodríguez y colaboradores (Rodríguez et al., 2008); por su parte, *Euglypha* sp que suele asociarse a una baja concentración de sólidos (Rodríguez et al., 2008), presentó correlación significativa con la temperatura y con *Arcella* sp, pudiendo considerarse ambas como bioindicadoras de cambios en la temperatura del licor mezcla así como de una nitrificación parcial, al correlacionarse con la concentración de N-NO₂⁻.

Respecto a los protistas ciliados observados en esta EDAR, *Plagiocampa* sp presentó correlación significativa con la temperatura, así como con el Nkjeldahl y el NT, y *Plagiopyla* sp, respecto al N-NH₄⁺. El primero de los géneros se propone como bioindicador de un buen

rendimiento en la eliminación de nitrógeno mientras que el segundo sería indicador de alta carga de N-NH_4^+ en el tratamiento biológico. La especie *Trochilia minuta*, la cual se ha reportado en otros trabajos como bioindicadora de baja carga másica (Zornoza, 2012) así como de una baja concentración de sólidos (Dubber & Gray, 2011), en esta instalación presentó correlación con el TRC de modo que su abundancia parece verse favorecida por valores altos de TRC siendo, por tanto, bioindicadora de una alta edad del fango; hay que destacar que en la planta estudiada ésta es una característica ya señalada y que esta especie de ciliado ha alcanzado unos valores de presencia y abundancia considerables, por lo que la propuesta concuerda con los resultados. Altas densidades de *Vaginicola* sp se correlacionaron con valores altos de SSLM, SSLVM y V30, la cantidad de sólidos en el reactor con baja capacidad de sedimentación favorecen la abundancia de este ciliado en esta instalación. Por otra parte, *Vorticella striata* muestra correlación negativa con la temperatura del licor mezcla, pudiendo considerarse como indicadora de bajas temperaturas en el mismo, mientras que una baja densidad de *Tokophrya* sp se relaciona con N-NO_3^- y TON, pudiendo considerarse como buen indicador de un adecuado proceso de nitrificación.

En cuanto a los micrometazoos, el grupo de los rotíferos fue el único grupo que se postuló como posible bioindicador de la carga másica del reactor al haber presentado correlación significativa con SSLM y SSVLM. A los rotíferos se les considera indicadores de un buen funcionamiento del proceso de depuración, siempre y cuando no alcancen densidades excesivas, ya que una gran concentración de rotíferos indica un elevado tiempo de retención del fango (Fernández-Galiano et al., 1996), aunque las densidades observadas para este grupo (2, 3 y 3 ind/mL para la cámara anóxica, aeróbica y reactor MBR respectivamente) son bajas, el proceso de depuración es bueno, pero, en esta comparación, se debe tener en cuenta que las instalaciones presentan diferentes características de diseño no obstante, son propuestos como buenos bioindicadores del proceso de depuración.

Los resultados de estos análisis pueden ser de gran importancia para el correcto control de las EDAR, como han argumentado algunos autores (Di Marzio, 2002; Finocchiaro & Cingolani, 1995; Puigagut et al., 2007). La inmediatez con la que se puede adquirir la información que proporcionan permite a los técnicos y operadores de una planta realizar medidas correctivas y/o preventivas en tiempo real, evitando disfunciones prolongadas o insostenibles (Signorile et al., 2010). Adicionalmente, el estudio de los componentes biológicos de los fangos activos proporciona una información relevante a contemplar en el histórico de la planta (Signorile et al.,

2010). En este estudio se demuestra claramente que la identificación y enumeración de protistas en el licor mezcla de los fangos activos puede proporcionar información rápida sobre las condiciones operativas y del rendimiento de la planta.

5.2.2.2. *Los procariotas*

En contraposición al estudio realizado por Zheng y Wen (Zheng & Wen, 2019), en el que sus autores ponen de manifiesto el escaso número de muestras analizadas como una limitación para una correcta comprensión del establecimiento y evolución de las comunidades de bacterias en los biorreactores de las EDAR con sistemas MBR, en este trabajo se realizó un estudio más amplio que implicó un mayor número de muestras analizadas (69) y un periodo de tiempo de estudio más prolongado (2 años). Asimismo, se ha hecho un seguimiento más detallado respecto a taxones bacterianos relevantes en la eliminación de nitrógeno (de Celis et al., 2022) y a los relacionados con el bioensuciamiento (Liébana et al., 2016).

5.2.2.2.1. Estructura y dinámica de la población procariota

Las bacterias son los componentes principales de la comunidad del fango activo y suelen representar alrededor del 80 % del total de microorganismos presentes en los biorreactores (Seviour & Nielsen, 2010). Los filos predominantes identificados en este trabajo coincidieron con los descritos por otros autores (de Celis et al., 2022; Gao et al., 2016; Hu et al., 2012; Ju et al., 2014; Shanks et al., 2013; Yongkui Yang et al., 2020) siendo éstos los pertenecientes a *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* y *Actinobacteria*.

La aplicación de técnicas moleculares modernas, independientes de cultivo, en estudios ecológicos de sistemas de tratamiento de aguas residuales (Loy et al., 2002; Onuki et al., 2000; Snaidr et al., 1997; Wilderer et al., 2002), ha facilitado enormemente la adquisición de datos cuya interpretación permite a los investigadores una mayor comprensión de la dinámica de las comunidades microbianas en estos ecosistemas (Saikaly et al., 2005). Además, en los sistemas biológicos de tratamiento de aguas residuales, estos conocimientos benefician tanto al investigador como al profesional gestor de la instalación (Baptista et al., 2014). Los perfiles taxonómicos representados para una muestra y sus abundancias relativas se construyen a partir del análisis de las HVR (regiones hipervariables) del ADNr 16s. Los grupos procariotas (dominio

Bacteria y *Archaea*) se identifican en función de la composición de HVR, y el número de lecturas atribuidas a cada grupo se utiliza para calcular la abundancia relativa de esos microorganismos en una muestra (Chan et al., 2019). La asignación taxonómica basada en HVR es fiable hasta el nivel de género y disminuye sustancialmente a nivel de especie (Bokulich et al., 2018). La asignación de especies solo se recomienda para las secuencias HVR que coinciden exactamente con las secuencias de la base de datos de referencia (Edgar, 2018). La Base de datos microbiana para fangos activos (*Microbial Database for Activated Sludge, MiDAS*), consultada en este trabajo, es una plataforma web que permite la integración de datos sobre la identidad de microorganismos abundantes y críticos de proceso en sistemas de tratamiento de aguas residuales de fangos activos con información sobre su importancia funcional, morfología, diversidad y distribución (McIlroy et al., 2015).

Por otro lado, el estudio de la importancia de los factores ambientales en el ensamblaje de la comunidad bacteriana resulta de gran interés en el ámbito de la microbiología aplicada (Isazadeh et al., 2016). Según Ju & Zhang (2015), las condiciones ambientales explican parcialmente las variaciones filogenéticas y cuantitativas e influyen directamente en el establecimiento de las poblaciones bacterianas, siendo las interacciones biológicas las más relevantes en la determinación de la estructura de la comunidad bacteriana en las EDAR. No obstante, modificaciones en las condiciones de operación, como las que se han identificado en este trabajo (cambios en la recirculación y del caudal de purga de fangos) han determinado variaciones reseñables en la comunidad bacteriana de la instalación investigada. Una vez estabilizado el ecosistema de fangos activos, se requiere conocer y comprender la capacidad funcional de las poblaciones bacterianas allí desarrolladas (Saikaly & Oerther, 2011) y monitorizar en el tiempo la estabilidad de dicha comunidad pudiendo considerarse como un nuevo parámetro de control del funcionamiento de la EDAR (de Celis et al., 2020).

Cabe señalar que una comunidad exógena (fangos activos), proveniente de otra EDAR, se utilizó como inóculo para iniciar la operación de esta instalación. A medida que transcurrieron los primeros meses, no se observó un patrón estacional en la integridad de la comunidad de bacterias del tratamiento biológico como han descrito investigadores en otras plantas de tratamiento (Ju et al., 2014; Wu et al., 2019), sino que se detectó una evolución constante de la composición de la comunidad que parecía corresponder a distintas etapas en la adaptación de la comunidad, posiblemente debida a los cambios en la operación llevados a cabo en la planta. Además, en un estudio comparativo realizado entre dos EDAR, siendo la EDAR Arroyo

Valenoso una de ellas, se observó en esta instalación un incremento en la abundancia de AVS correlacionados positivamente con las tasas de eliminación de NT y PT a medida que transcurría el tiempo desde su puesta en marcha (de Celis et al., 2022). La afiliación taxonómica de los filotipos detectados reveló géneros bacterianos como *Accumulibacter*, *Haliangium*, *Nitrospira*, *Nitrosomonas*, *Pirellula*. La hipótesis para explicar la evolución de la población bacteriana es que las poblaciones provenientes de la comunidad de siembra utilizada como inóculo podrían no estar adaptadas a este nuevo entorno y, por lo tanto, disminuirían su abundancia en favor de otras más adaptadas y que realizan el proceso depurativo del agua residual en esta EDAR de manera más eficiente (de Celis et al., 2022).

Podría determinarse, a partir de los estudios de NMDS y de la evolución de la diversidad de la comunidad bacteriana realizados, que el microbioma analizado en el biorreactor se encontraría inicialmente en una etapa de adaptación al ambiente de la EDAR ya que su dinámica comunitaria mostraba una sucesión constante no cíclica, sutilmente afectada por cambios ambientales estacionales. Posteriormente, la dinámica de la comunidad observada sugiere que los patrones de ensamblaje y sucesión se rigen por procesos deterministas que seleccionarían ciertas comunidades bacterianas (de Celis et al., 2022; Meerburg et al., 2016).

5.2.2.3. *El microbioma y sus relaciones*

Una vez obtenidos todos los datos sobre las poblaciones de protistas, micrometazoos y procariontes de la EDAR Arroyo Valenoso se propuso, en este trabajo, la determinación de redes de coocurrencia. Estas redes incluyen las asociaciones potenciales entre taxones en el sistema estudiado y permiten la evaluación de afinidades potenciales con preferencias de hábitat o nichos ecológicos (Chaffron et al., 2010). Este planteamiento ha representado un enfoque novedoso en el ámbito de la ecología de los fangos activos de las EDAR, no habiéndose encontrado bibliografía con estudios similares, y se ha articulado desde el punto de vista de la relación entre protistas y bacterias contemplando, fundamentalmente, la influencia de la depredación (Decamp & Warren, 1998; Ratsak et al., 1996; Salvadó et al., 1995).

La depredación por parte de los protistas se considera una de las principales causas de la disminución del número de bacterias en los ecosistemas acuáticos y terrestres (Jürgens & Matz, 2002; Sherr & Sherr, 2002). Los protistas heterótrofos como los nano flagelados y ciliados han sido ampliamente descritos como los principales consumidores de bacterias en la

mayoría de los sistemas acuáticos (Berninger et al., 1991; Šimek et al., 1995). Los impactos de la depredación de protistas sobre las comunidades bacterianas se basan en la compleja interacción de varios factores como la selección de las presas, las condiciones de crecimiento o la competencia bacteriana para la eliminación de competidores (Jezbera et al., 2005). En particular, la depredación por parte de los ciliados se produce a través de estrategias específicas de captación fagotrófica siendo el tamaño, el tipo de nutrientes (relación C/N), la morfología de la presa, así como las condiciones ambientales, los factores que determinan su capacidad depredadora (Jezbera et al., 2005; Pfister & Arndt, 1998). La bacterivoría es también muy importante en el proceso de fangos activos ya que los protistas contribuyen de esta manera a la eliminación de bacterias patógenas y fecales (Bitton, 2002). Todo lo expuesto previamente nos hace considerar que la coocurrencia entre las especies de protistas y la comunidad bacteriana podría estar relacionada con la depredación, incluso podría resultar una ventaja adaptativa para las bacterias, dado que la correlación respecto a los protistas y micrometazoos es significativa, por lo que la presencia de los taxones de eucariotas identificados (*Entosiphon*, *Litonotus*, *Pseudochilodopsis*, *Thuricola* y los ácaros) estarían modulando y/o seleccionando a ciertos géneros bacterianos frente a otros, entre ellos, se incluyen *Nitrospira*, *Nitrosomonas*, *Zooglea*, *Thiotrix*, *Nocardia*, *Ferruginibacter* o *Accumulibacter*, debido a que su coocurrencia es predominantemente positiva.

Una alternativa a esta propuesta es que, aun existiendo depredación protistas/bacterias, ya sea específica o generalista, una estructura de la comunidad microbiana flexible junto a la actividad de los miembros de esa comunidad, promovería la recuperación del sistema desconociéndose si la adaptación y el cambio en la comunidad microbiana en el biorreactor MBR influirían en otros procesos biológicos, incluida la estabilidad del fango activo (Wan et al., 2011). Estudios piloto en sistemas MBR, en los que se monitorizaron los cambios en la estructura de la comunidad a largo plazo, han demostrado que las poblaciones bacterianas son diversas y dinámicas (Miura et al., 2007; Stamper et al., 2003) incluso durante los períodos de operación estable. La coocurrencia observada entre protistas y bacterias en la instalación estudiada podría deberse, entonces, a que la comunidad bacteriana presente en la EDAR Arroyo Valenoso se adapta y evoluciona de manera que los filos bacterianos que la componen se van adaptando, siendo, por tanto, la relación entre las poblaciones de protistas, micrometazoos y bacterias más una coincidencia poblacional que una relación trófica. Otros dos aspectos para valorar y que podrían explicar esta coocurrencia serían: la incorporación de especies diferentes a las presentes en el biorreactor a través del influente y la extinción de bacterias de la comunidad autóctona,

aunque en relación con este último, habría que recordar que los MBR tienden a mantener altas concentraciones de biomasa y una menor producción de lodo.

Podemos concluir esta sección destacando que el diagnóstico macro y microscópico de fangos activos de EDAR, así como el conocimiento de la composición de poblaciones microbianas como protistas, micrometazoos y bacterias, aportan información relevante para evaluar el control y rendimiento de la depuración de aguas residuales además de constituir una poderosa herramienta que facilita la comprensión del ecosistema del fango activo en favor de una gestión más eficaz y eficiente de las EDAR.

5.3. El proceso de nitrificación

La nitrificación es esencial en el tratamiento biológico de aguas residuales para eliminar el exceso de nitrógeno (Daims & Wagner, 2010). La presencia de nitrógeno en las descargas de aguas residuales puede ser indeseable por varias razones: 1) el amoníaco libre es tóxico para los peces y muchos otros organismos acuáticos y 2) el nitrógeno amoniacal necesita una demanda de oxígeno muy elevada pudiendo llegar a agotar el oxígeno disuelto de la masa de agua. La toxicidad del amoníaco en solución es directamente atribuible a la especie NH_3 , cuya concentración aumenta con el pH y la temperatura del agua (Horan, 1993; Sedlak, 1991).

Los resultados obtenidos en relación a la concentración de nitrógeno y compuestos nitrogenados en el efluente indican una buena eficiencia de la depuración, como ya se ha comentado con anterioridad, lo que implica que las comunidades de bacterias nitrificantes y desnitrificantes presentes en el biorreactor están activas. En las últimas décadas se ha descubierto que el proceso de nitrificación en particular, no es llevado a cabo exclusivamente por dos grupos bacterianos diferentes (AOB y NOB) que oxidan respectivamente el amonio y los nitritos hasta nitratos (Aravinthan et al., 2001; Daims & Wagner, 2010; Drysdale et al., 2001), sino que las denominadas bacterias *comammox* (ciertas especies pertenecientes al género *Nitrospira*) pueden llevar a cabo ambos procesos metabólicos (Daims et al., 2015), véase Figura 5.1.

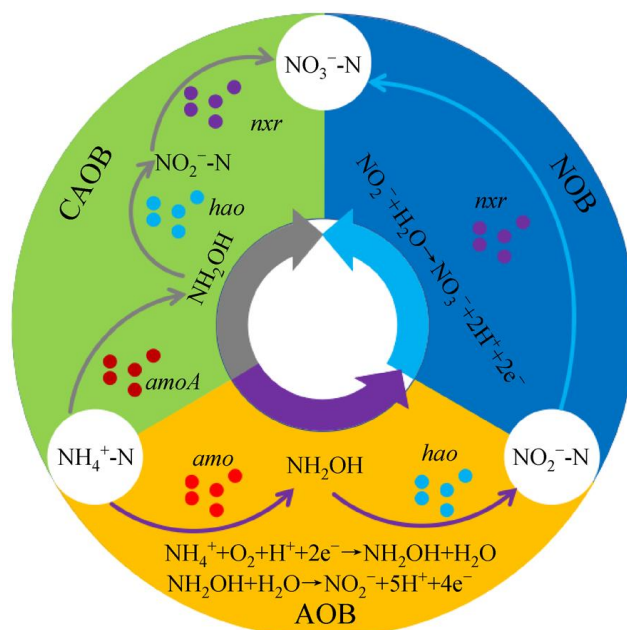


Figura 5.1: Diferencias entre la nitrificación microbiana tradicional, bacterias AOB con fondo amarillo y bacterias NOB con fondo azul, y la nitrificación bacteriana comammox, con fondo verde (Luo2022).

5.3.1. Bacterias amonio oxidantes y bacterias nitrito oxidantes

Las bacterias responsables de la nitrificación son quimilitótrofas (amonio o nitritos como donadores de electrones en un proceso de respiración aerobia) y autótrofas, en las depuradoras predominan claramente los géneros *Nitrosomonas*, *Nitrobacter* y *Nitrospira* (Lücker et al., 2010; Wagner & Loy, 2002). Además, el género *Nitrotoga* también se consideró putativamente como el oxidante de nitrito primario en el fango activo (Lücker et al., 2015; Saunders et al., 2003).

La temperatura se considera uno de los factores que más afectan a la abundancia de AOB en las EDAR (Cyzdik-Kwiatkowska et al., 2012; Siripong & Rittmann, 2007) siendo más sensibles a ella en los reactores de fangos activos que en el influente (Wan et al., 2011), no obstante en la EDAR estudiada este parámetro parece influir en menor medida puesto que toda la instalación está cubierta y las oscilaciones del mismo son menores. En cuanto a las bacterias oxidantes de nitritos (NOB), el crecimiento de *Nitrospira* sp en las EDAR se ve favorecido por el bajo nivel de oxígeno disuelto y el TRC alto; como ya se indicó, estas condiciones de oxígeno disuelto son las que se han observado en esta instalación, siendo la concentración del mismo de $0,05 \pm 0,034$ mg O_2/L tanto en la cámara anóxica como en la aeróbica. La abundancia de

Nitrobacter sp. aumenta en la temporada de invierno, en los meses en que el oxígeno disuelto es más alto (Huang et al., 2010).

El escaso conocimiento que existe hoy en día sobre la ecología de las NOB se debe, principalmente, a la ausencia de herramientas moleculares específicas para detectar bacterias NOB no cultivables como es el caso de *Nitrospira*, y en condiciones que no son fácilmente aptos para *FISH* (Pester et al., 2014). En este trabajo se han empleado cebadores específicos para su detección mediante tecnologías de PCR (Francis et al., 2005; Jiang et al., 2020; Klindworth et al., 2013; Pester et al., 2014; Rotthauwe et al., 1997; Y. Xia et al., 2018). El mejor marcador funcional específico para la detección molecular de NOB es la enzima clave de la oxidación de nitritos, la nitrito oxidorreductasa (*Nxr*). Esta enzima se presenta en dos formas filogenéticamente distintas, un tipo citoplásmico que se encuentra en las NOB como *Nitrobacter* o *Nitrococcus* (Sorokin et al., 2012) y un tipo periplásmico que se encuentra en *Nitrospira* y *Nitrospina* (Lücker et al., 2013; Lücker et al., 2010; Spieck & Bock, 2005). Ambas formas pertenecen a la familia de molibdoenzimas complejas de hierro y azufre (CISM) (Rothery et al., 2008) y consisten en una subunidad alfa (*NxrA*), una beta (*NxrB*) y otra gamma (*NxrC*) (Lücker et al., 2010; Spieck et al., 1998). En este estudio se utilizaron las secuencias genómicas diseñadas para cebadores de PCR que se dirigen al gen *NxrB* de *Nitrospira* (Pester et al., 2014) permitiendo detectar su presencia y diferenciar a las *Nitrospira* nitrito oxidantes del resto de sNOB poniendo de manifiesto la importante representación de este género en la EDAR Arroyo Valenoso. Además, mediante el empleo de cebadores dirigidos al gen *cynS* (cianasa), se detectó de manera específica al grupo de las sNOB (Jiang et al., 2020).

5.3.1.1. *Nitrospira comammox*

Tal y como ya se comentó en la Introducción, todas las bacterias *comammox* conocidas hasta la fecha pertenecen al sublinaje II de *Nitrospira*, pero aún se desconoce si otros sublinajes de *Nitrospira* también contienen miembros *comammox* (Daims et al., 2001; Lebedeva et al., 2008; Lebedeva et al., 2011). Resulta imposible inferir a partir del gen *ADNr 16S* o de las filogenias *nxB* si las bacterias *Nitrospira*, aún no caracterizadas, son *comammox* o sNOB (González-Martínez et al., 2016). La subunidad A de la enzima amonio monooxigenasa (*amoA*), que oxida el amonio a hidroxilamina, proporciona una mayor resolución filogenética que el ARNr 16S para la diferenciación de amonio oxidantes estrechamente relacionados (Pester et al., 2012; Purkhold et al., 2000), permitiendo a su vez diferenciar los dos clados

existentes descritos de *Nitrospira comammox* (Daims et al., 2015). Existe también el enfoque de PCR de dos pasos propuesto por Wang y colaboradores (2017) que ha supuesto ser valioso para la identificación de posibles miembros novedosos de la familia de monooxigenasa de membrana que contienen cobre (Wang et al., 2017); sin embargo, otras estrategias de qPCR recientemente desarrolladas y dirigidas al gen *amoA comammox* mencionado previamente, parecen más adecuadas para analizar la distribución y abundancia de *comammox* en muestras ambientales (Fowler et al., 2018; Pjevac et al., 2017).

Se han diseñado distintos cebadores dirigidos a los genes *amoA* codificados por estas bacterias (Bartelme et al., 2017; Fowler et al., 2018; Pjevac et al., 2017; Wang et al., 2017) y, mediante los ensayos de PCR dirigidos a la detección de *comammox* clado A y B de manera independiente, se han podido observar nitrificantes *comammox* en numerosos ambientes, incluidos sistemas artificiales como ETAP y EDAR, y hábitats naturales, como bosques y suelos de arrozales, rizosfera del arroz y sedimentos lacustres (Pjevac et al., 2017). En este trabajo se ha empleado la técnica de PCR digital que ha permitido detectar y cuantificar a este grupo de nitrificantes de manera más sensible, con una manipulación experimental más sencilla y obteniendo unos resultados, *a priori*, más fiables que usando las técnicas de PCR convencional o cuantitativa en tiempo real.

Por otra parte, el genoma de las bacterias *comammox* codifica para el gen de la enzima nitrito reductasa (*nir*) pero carece del gen de la enzima óxido nítrico reductasa (*nor*), por lo que, en teoría, durante su metabolismo, produce NO pero no N₂O (Kits et al., 2019), considerado un gas de efecto invernadero (Luo et al., 2022). Este aspecto resulta relevante dado que aproximadamente el 80% de las emisiones de gases de una EDAR se liberan en la zona aireada del tratamiento biológico (Baeten et al., 2020) y, en el año 2020 en España, el 5% de las emisiones de N₂O (óxido nitroso) de origen antropogénico se han atribuido a las EDAR (MITECO, 2022). Por tanto, la presencia de estas bacterias favorecería la reducción de las emisiones de este contaminante en este tipo de instalación. De hecho, las bacterias *comammox* parecen estar omnipresentes en las EDAR y representar entre el 0,02% y el 3% de la comunidad bacteriana total en fangos activados con eliminación de nitrógeno (Annavajhala et al., 2018; Cotto et al., 2020; Spasov et al., 2020). Según los resultados obtenidos en este trabajo la proporción de bacterias *comammox* puede llegar a ser más alta y representar hasta cerca de 7 % respecto del total de bacterias, más del doble de lo descrito previamente por otros autores. Asimismo, la abundancia de estas bacterias *comammox* en ETAP y EDAR puede representar entre el 46% y 100%, en

copias del gen *amoA*, respecto de otros procariotas oxidantes de amonio (AOA y AOB) (X. Zhou et al., 2021) y, en la EDAR estudiada, supusieron el 91,50% (en copias/ μ L) de las bacterias oxidantes de amonio de la muestra, indicando que las bacterias *comammox* pueden desempeñar un papel importante en la eliminación biológica de nitrógeno de las aguas residuales. Por último, nuestros resultados mostraron un dominio del clado A sobre el B, corroborando las observaciones realizadas en otros estudios previos (Camejo et al., 2017; Palomo et al., 2018; Roots et al., 2019).

Como alternativa a los métodos aplicados en este trabajo para visualizar *in situ comammox Nitrospira* Barrero-Canosa y colaboradores proponen el empleo de *direct-gene FISH* (Barrero-Canosa et al., 2017) para la detección del gen *amoA* mediante inmunofluorescencia dirigida a la proteína AMO, metodología propuesta y llevada a cabo por Fiencke y Bock (Fiencke & Bock, 2004) para la detección de ese gen en AOB y cuyos resultados han permitido corroborar la presencia de ese grupo de bacterias y determinar su posición en el flóculo. Debe considerarse que el uso de sondas para la identificación y cuantificación *in situ*, debe realizarse con precaución teniendo en cuenta sus especificidades reales (Lukumbuzya et al., 2020), dado que el grado de conservación de la secuencia de bases en el sitio de unión de la sonda en el ARN ribosómico puede dar lugar a la detección de una sola especie microbiana o un grupo objetivo filogenético más grande, como un género completo, filo o incluso dominio (Amann et al., 1995). La especificidad de las sondas *Nitrospira FISH* (*Ntspa662* y *Ntspa712*) es razonablemente buena al presentar baja hibridación fuera del filo *Nitrospirae*. Sin embargo, la resolución de la sonda *Ntspa476* para distinguir entre los genes *ADNr 16s* de *comammox* y NOB canónicos no es clara, al hibridar en las secuencias de genes de *Nitrospira* canónica del sublinaje II pero no de *Ntspa476*; lo que sugiere que la sonda *Ntspa476* probablemente no sea capaz de discriminar fielmente a *Nitrospira comammox* respecto de *Nitrospira* por lo que la abundancia de *Nitrospira comammox* podría estar sobreestimándose (Roots et al., 2019).

Tal y como hemos constatado, las bacterias *comammox* son de gran importancia tanto en sistemas artificiales como naturales, pero las diferencias de nicho y los factores que influyen particularmente sobre todas las poblaciones de nitrificantes [AOB, NOB y AOA (contempladas en el siguiente apartado)] siguen sin estar claras y continúan las investigaciones en este ámbito (Luo et al., 2022). El metabolismo de las bacterias *comammox* es complejo y puede adaptarse a diferentes sustratos (Daims et al., 2015; Han et al., 2019; Kits et al., 2017; Liu et al., 2020; Shen et al., 2016; van Kessel et al., 2015; Wang et al., 2021; Zhao et al., 2021). Los factores

ambientales que favorecen el desarrollo de poblaciones de bacterias *comammox* en los sistemas de eliminación de nitrógeno de aguas residuales parecen ser los siguientes:

1) Concentraciones de amonio: las bacterias *comammox* prevalecen en los sistemas naturales y en los artificiales diseñados para operar con concentraciones de amonio relativamente bajas (Fowler et al., 2018; Luo et al., 2022; Pjevac et al., 2017). La concentración promedio registrada en la cámara aeróbica de la EDAR Arroyo Valenoso fue de 0,866 mg N-NH₄⁺/L. La afinidad por el amonio de las bacterias *comammox* es de 1 a 3 magnitudes más baja que la de las AOB (Kits et al., 2017; Sakoula et al., 2020).

2) Parámetros de operación: estudios previos realizados en otras EDAR revelaron que TRC largos (fangos activos > 12,5 d) y bajas concentraciones de OD (0,2–1,0 mg/L) favorecen a las bacterias *comammox* sobre los nitrificadores canónicos (Cotto et al., 2020; Palomo et al., 2018; Roots et al., 2019). Estas condiciones coinciden con las de operación de la EDAR estudiada en este trabajo, que presenta unos valores medios del TRC de 75,24±39,14 d y un OD de 0,05±0,0,34 mg O₂/L siendo, por tanto, unas condiciones ambientales óptimas para el crecimiento de bacterias *comammox* en el biorreactor.

3) pH y temperatura: se ha descrito que cuando el pH se encuentra entre 6,74 y 8,65 la abundancia de bacterias *comammox* se correlaciona positivamente con este parámetro (Sun et al., 2020), también han mostrado actividad nitrificante a pH 3–4 lo que indica que las bacterias *comammox* pueden adaptarse a valores bajos de pH (Takahashi et al., 2020). El valor medio de pH registrado durante el periodo de muestreo fue de 6,686±0,096 Ud estando, por tanto, muy próximo al rango descrito por Sun y colaboradores (Sun et al., 2020). Otro parámetro por considerar es la temperatura. La temperatura registrada durante el estudio fue de 17,82±4,31°C mostrando que también pueden desarrollarse en un amplio rango de temperaturas, como ya sugirieron Daims y colaboradores (Daims et al., 2016) que propusieron un intervalo que abarcaría desde los 10°C hasta los 28°C. Otros autores manifestaron que este parámetro podría llegar a ser un factor clave y afectar a la estructura de las poblaciones de bacterias *comammox* (Shi et al., 2020).

El “estilo de vida oligotrófico” (Kits et al., 2017) de las bacterias *comammox* sugiere que, si bien se han detectado en EDAR (Daims et al., 2015; Pjevac et al., 2017; van Kessel et al., 2015), es posible que no puedan competir con otros oxidantes de amoníaco en entornos tan

ricos en nutrientes. Dos estudios sobre bacterias *comammox* en EDAR confirmarían este hecho (Annabhajjala et al., 2018; González-Martínez et al., 2016), ya que el primero de ellos afirmó que la abundancia relativa de *Nitrospira comammox* en estos ambientes es muy baja (0,08 %), mientras que en el segundo la abundancia relativa estaría entre el 0,28 y 0,64 %; resultados muy inferiores a los que se han mostrado en este trabajo y que ya ha sido comentados con anterioridad.

Arqueas amonio oxidantes (AOA)

Otro de los hitos en la investigación del proceso de la nitrificación fue el descubrimiento de las arqueas quimiolitótrofas oxidantes de amonio (AOA) (Könneke et al., 2005). Al igual que las bacterias *comammox*, las AOA son miembros novedosos del grupo de microorganismos nitrificantes que fueron descubiertos mediante secuenciación genómica en lugar de con el empleo de metodologías tradicionales basadas en cultivos (Xu et al., 2021). En este trabajo han sido detectadas y cuantificadas mediante la tecnología de la PCR digital.

La presencia de AOA en las EDAR ha sido ampliamente descrita (Pan et al., 2018; Sauder et al., 2012), variando su abundancia relativa entre el 0,07 % y el 96,04 % del total de microorganismos oxidantes de amonio (Gao et al., 2014; Limpiyakorn et al., 2011; Park et al., 2006; Yin et al., 2018). En la muestra analizada en este estudio la proporción de AOA, respecto de las amonio-oxidantes totales, supone el 0,02%, proporción inferior a la descrita por otros autores (Gao et al., 2014; Limpiyakorn et al., 2011; Park et al., 2006; Yin et al., 2018).

La presencia de las AOA en el licor mezcla está condicionada por diversos factores tales como: altas concentraciones de amonio, bajas concentraciones de oxígeno disuelto, TRC prolongados y bajas temperaturas (Xu et al., 2021); estas condiciones se han observado solo parcialmente en la cámara aeróbica de Arroyo Valenoso. La baja abundancia de AOA en los fangos activos de la mayoría de las EDAR municipales (Gao et al., 2013; Mußmann et al., 2011; Wells et al., 2009) se atribuye a su sensibilidad por la disponibilidad de cobre causada por la quelación de este metal con compuestos orgánicos (Gwak et al., 2020). Es probable que este efecto contribuya al predominio comúnmente observado de AOB en estos entornos artificiales (Lukumbuzya et al., 2020). Sin embargo, la EDAR Arroyo Valenoso podría llegar a ser propicia para albergar una población destacable de estos microorganismos procariotas en el licor mezcla

tanto como por las características del agua influente como por el diseño y la operación de la instalación que se lleva a cabo.

Finalizar este apartado comentando que los distintos grupos de procariotas nitrificantes pueden actuar unos con otros pudiendo intercambiar, entre ellos, compuestos orgánicos o factores de crecimiento así como posibilitar la adquisición de nutrientes inorgánicos, especialmente si alguno de ellos carece de vías biosintéticas importantes (Pester et al., 2014). El estudio de estas interacciones es un tema de trabajo relevante para abordar en investigaciones futuras. Diferencias por la afinidad al sustrato de la enzima amoA y la presencia de las enzimas hidroxilamina deshidrogenasa y/o la enzima nitrito oxidoreductasa, confieren a estos grupos microbianos diferentes capacidades para llevar a cabo la degradación de otros contaminantes (además de los relacionados con el nitrógeno) presentes en el agua residual como, por ejemplo, determinados antibióticos. Ya se han descrito procesos de cometabolismo para la sulfonamida (Zhou et al., 2019), la lincomicina, la ciprofloxacina, la norfloxacina o la ofloxacina (L. J. Zhou et al., 2021), así como para un plaguicida conocido como carbendazima (Han et al., 2019).

5.4. Formación de biopelículas y comunicación celular: el problema del bioensuciamiento

Como se ha podido constatar, las poblaciones microbianas en los biorreactores de las EDAR difieren en el tiempo y entre las distintas estaciones del año, siendo los filos *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Actinobacteria* los más abundantes en estas comunidades (de Celis et al., 2020; de Celis et al., 2021; Wu et al., 2019), incluyendo la del reactor MBR de la EDAR estudiada. Nuestros resultados indicaron que estas poblaciones se modulan y cambian en respuesta a las variaciones en los procesos de operación de la instalación.

En ciertas circunstancias, las comunidades microbianas se coordinan mediante procesos de *QS* para crecer como agregados incrustados en una matriz de Sustancias Poliméricas Extracelulares (EPS), en las denominadas biopelículas (de Celis et al., 2021; Flemming et al., 2016; Kumar et al., 2017). Las biopelículas representan una forma de vida esencial y un mecanismo exitoso de colonización de bacterias en numerosos ecosistemas naturales y artificiales (Huang et al., 2019; Kim et al., 2017). Son sistemas complejos que requieren altas densidades celulares y, por lo general, comprenden diversas especies (Flemming et al., 2016). En el estudio realizado sobre las membranas del reactor MBR de la EDAR Arroyo Valenoso, se obtuvo una densidad

celular de bacterias viables cultivables de $1,40 \times 10^6$ UFC/L, que no se podría considerar como muy elevada, aunque se debe recordar que este resultado proviene del estudio de una sola muestra.

Estudios previos en membranas de reactores MBR señalan que *Bacteroidetes* y *Firmicutes* muestran mayores abundancias en las biopelículas que en el fango activo (Lim et al., 2012), mientras que otros encontraron que son las *Gammaproteobacteria*, representadas principalmente por *Pseudomonas* y *Aeromonas*, las que forman preferentemente biopelículas en las membranas (Zhang et al., 2014), lo cual concuerda con nuestros resultados. Los filos *Gammaproteobacteria* y *Actinobacteria* parecen ser las bacterias dominantes en las biopelículas tanto en la etapa inicial como en la tardía de ensuciamiento en sistemas MBR sumergidos (Lim et al., 2012; Zhang et al., 2014), lo que coincide con lo observado en las membranas de la EDAR investigada, aunque sería preciso llevar a cabo más experimentos y analizar un número mayor de muestras.

Está descrito ampliamente que los géneros bacterianos *Aeromonas*, *Microbacterium*, *Pseudomonas* y *Klebsiella* son formadores de biopelícula, habiéndose encontrado tanto en ambientes clínicos (Kumar et al., 2017; Yin et al., 2012) como alimentarios (Bellassi et al., 2020; Doll et al., 2017) además de en el licor mezcla y en las membranas de filtración de EDAR con sistemas MBR (de Celis et al., 2021; Luo et al., 2017; Zhang et al., 2014). De las doce cepas aisladas e identificadas procedentes de la membrana de ultrafiltración de la EDAR Arroyo Valenoso, dos pertenecen al género *Aeromonas*, dos a los géneros *Pseudomonas* y *Klebsiella*, una al género *Stenotrophomonas* y una al género *Microbacterium*, es decir, las cepas aisladas pertenecen a géneros cuya presencia es habitual en EDAR, tanto en el licor mezcla como formando biopelículas.

Hay que destacar que *Microbacterium* spp son bacterias con una alta capacidad de adhesión a superficies abióticas, tal y como se observó en los ensayos realizados, siendo además resistente frente a la limpieza y desinfección (Zhu et al., 2020; Zhu et al., 2021). Estas características son claves para explicar su presencia en las membranas del compartimento MBR, puesto que le confieren una elevada capacidad colonizadora de superficies (Bellassi et al., 2020), pudiendo resistir, a su vez, a tratamiento periódicos de limpieza de las membranas.

El género *Aeromonas* representa otro grupo interesante de bacterias respecto al funcionamiento multicelular de las biopelículas (Talagrand-Reboul et al., 2017). Son patógenos oportunistas ambientales de animales y humanos y son responsables de diversas enfermedades en peces y en humanos (Talagrand-Reboul et al., 2017). Las cepas de *Aeromonas* sp y *Aeromonas hydrophila*, ensayadas en el laboratorio, indujeron la síntesis de violaceína en la cepa biosensora CV026. En este género, así como en la especie *Aeromonas hydrophila*, el proceso de QS está mediado por el sistema *LuxI/LuxR* como ya se comentó en la Introducción, y está inducido por AHL de cadena corta (C4-AHL, C6 AHL) (Talagrand-Reboul et al., 2017), lo cual concuerda con nuestros resultados.

Por su parte, *Stenotrophomonas maltophilia* es un patógeno humano común en las aguas residuales, que presenta resistencia a antibióticos (Kim et al., 2018) y para la cual se ha demostrado, en este trabajo, su alta capacidad de adherencia, pudiendo llegar a ser relevante en la formación de biopelículas. Por el riesgo sanitario que representa, sería de gran interés un estudio más completo puesto que su presencia en esas biopelículas desarrolladas en las membranas de los MBR podrían ser reservorios de ese microorganismo.

También se ha reportado que algunos órdenes pertenecientes al filo *Proteobacteria*, como *Burkholderiales*, *Pseudomonadales* y *Rhizobiales*, aumentan su abundancia en biopelículas en relación con otras poblaciones del fango activo (Luo et al., 2017). *Pseudomonas* spp., específicamente *Pseudomonas aeruginosa*, utiliza una densa red de receptores y reguladores de detección de QS mediado por AHL (Papenfort & Bassler, 2016). La cepa aislada perteneciente a este género no mostró este comportamiento. Un trabajo en *Pseudomonas putida* sugiere que la producción de autoinductores puede ser heterogénea en biopelículas inmaduras y que los autoinductores pueden desencadenar funciones de detección de quórum en células (Cárcamo-Oyarce et al., 2015), lo que indica que la función biológica de una señal de detección de QS puede variar dependiendo de las condiciones de crecimiento (Papenfort & Bassler, 2016). Además, los comportamientos de detección de QS a menudo se estudian de forma aislada, es decir, en cultivos agitados bien mezclados y/o en ausencia de otros microorganismos cooperantes o competidores, y esas son las condiciones que hemos empleado en el laboratorio para la realización de estos ensayos. Por tanto, sería deseable un estudio más detallado de la comunidad bacteriana desarrollada en la membrana de la instalación que proporcionaría una información más completa y próxima a la realidad sobre la dinámica de comunicación, además de incluir estudios

sobre la interacción a través de la señalización *QS*, la cual cumple funciones importantes a nivel comunitario en los sistemas de tratamiento de aguas residuales (Tan et al., 2021).

Como hemos visto, las biopelículas se forman a partir de un subconjunto específico de bacterias presentes en el fango activo y algunas han sido detectadas en este trabajo y mencionadas en párrafos anteriores. Es importante conocer estos microorganismos para, en última instancia, desarrollar técnicas que permitan evitar su incorporación y retrasar así el bioensuciamiento y, consecuentemente, alargar la vida útil de las membranas, reduciendo el coste de mantenimiento y/o de explotación (Luo et al., 2017).

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. La instalación estudiada cumple con los objetivos previstos en el diseño en términos de rendimiento y calidad del efluente vertido al cauce receptor.
2. La adquisición, tratamiento e interpretación de los numerosos datos recogidos durante este estudio, revelan las relaciones existentes tanto entre los factores bióticos y abióticos como aquellas que se establecen entre los distintos componentes de la comunidad biológica del fango activo. El conocimiento integral del sistema podría ser importante para el planteamiento de nuevas estrategias en la explotación de la EDAR, bien sea en términos de coste económico o en la modificación de las condiciones de operación.
3. En la EDAR estudiada se han determinado diferentes etapas desde la puesta en marcha de la depuradora hasta la estabilización del sistema, detectándose una evolución de las comunidades de protistas, micrometazoos y bacterias, debida tanto al proceso de colonización y estabilización de la microbiota, como a cambios de operación en la instalación.
4. Se ha registrado una alta diversidad de protistas y micrometazoos en los distintos compartimentos del tratamiento secundario y se han identificado nuevos bioindicadores de control de proceso, como es el caso de *Entosiphon* sp y *Tokophrya* sp, que serían indicadores de un buen desarrollo del proceso de nitrificación, *Chilodonella* sp de cambios en el pH, *Euglypha* sp y *Vorticella striata* que estarían asociadas a cambios en la temperatura del agua en el reactor y, por último, *Trochilia minuta* que ha demostrado ser una especie bioindicadora de cambios en el TRC.
5. El estudio de las comunidades de protistas y de bacterias, junto con los factores abióticos, ha permitido establecer nuevas herramientas para la bioindicación, ampliando los parámetros utilizados hasta la fecha en estudios similares. En este sentido, se ha observado la correlación de especies de protistas como *Litonotus* sp, *Entosiphon* sp, *Thuricola* sp, o *Pseudochilodonopsis* sp con la concentración de compuestos nitrogenados, así como con géneros bacterianos como *Nitrospira* y *Nitrosomonas*, implicados en el proceso de nitrificación.

6. Se ha puesto a punto el protocolo de PCR digital para el análisis de muestras de fango activo. Esta tecnología ha permitido cuantificar con precisión el número de copias de los genes diana seleccionados presentes en el material genético extraído de las muestras, y que han sido elegidos marcadores de distintos grupos microbianos nitrificantes: bacterias oxidantes de amonio y nitrito convencionales (AOB y NOB), bacterias del género *Nitrospira* y especies *Nitrospira comammox* y arqueas oxidantes de amonio (AOA).

7. La abundancia de bacterias *Nitrospira comammox* en esta EDAR es más elevada que la descrita hasta el momento en otras instalaciones similares. Este grupo representa, además, la mayor proporción de las bacterias nitrificantes observadas. Se ha determinado que en este tipo de EDAR resulta beneficioso mantener condiciones que favorezcan el crecimiento de las bacterias *comammox*, lo cual resulta no sólo en una buena eficacia en el proceso de nitrificación sino también en el coste de operación de la planta por las concentraciones bajas de oxígeno en las que se desarrollan estas bacterias.

8. Un conocimiento más completo sobre el metabolismo de las bacterias *comammox* y de las condiciones que favorecen su desarrollo en el fango activo puede contribuir a la reducción del efecto invernadero y sus consecuencias negativas sobre el medio ambiente, al disminuir la emisión de N₂O a la atmósfera durante la nitrificación. También resultan prometedoras para la eliminación de contaminantes emergentes posibilitando el desarrollo de estrategias de depuración de estos compuestos sin necesidad de hacer cambios en las instalaciones, adaptando únicamente las condiciones de operación de la EDAR.

9. Se ha comprobado la presencia en las biopelículas procedentes de las membranas de algunos géneros bacterianos ya descritos en estos sistemas como *Pseudomonas* y *Aeromonas*. Además, se ha aislado a partir de aquellas la especie *Stenotrophomonas maltophilia* (orden bacteriano de *Xanthomonadales*), que se ha revelado como fuertemente adherente y, por ello, se postula como nuevo filo relevante de la comunidad del fango implicado en el bioensuciamiento de las membranas.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- AENOR. (2005). UNE EN ISO/IEC 17025:2005: Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración In (15-06-2005 ed., pp. 38): Agencia Española de Normalización y Certificación.
- AENOR. (2007). OHSAS 18001:2007. Sistemas de gestión de la seguridad y salud en el trabajo. In (pp. 48). España: Agencia Española de Normalización y Certificación.
- AENOR. (2015a). UNE-EN ISO 14001:2015: Sistemas de gestión ambiental. Requisitos con orientación para su uso. In (15-09-2015 ed., pp. 48): Agencia Española de Normalización y Certificación.
- AENOR. (2015b). UNE EN ISO 9001:2015: Sistemas de gestión de la calidad. Requisitos. In (23-09-2015 ed., pp. 44): Agencia Española de Normalización y Certificación.
- Akinwole, P., Guta, A., Draper, M., & Atkinson, S. (2021). Spatio-temporal variations in the physiological profiles of streambed bacterial communities: implication of wastewater treatment plant effluents. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 37(8), 136. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03106-2>
- Akpor, O. B., & Momba, M. N. (2010). Relationship of protozoan biomass to phosphate and nitrate removal from activated sludge mixed liquor. *Biotechnology Journal*, 5(3), 304-313. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/biot.200900135>
- Al-Shahwani, S. M., & Horan, N. J. (1991). The use of protozoa to indicate changes in the performance of activated sludge plants. *Water Research*, 25(6), 633-638.
- Ali, L., Goraya, M. U., Arafat, Y., Ajmal, M., Chen, J. L., & Yu, D. (2017). Molecular Mechanism of Quorum-Sensing in *Enterococcus faecalis*: Its Role in Virulence and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci*, 18(5). <https://doi.org/10.3390/ijms18050960>
- Alm, E. W., Oerther, D. B., Larsen, N., Stahl, D. A., & Raskin, L. (1996). The oligonucleotide probe database. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10), 3557-3559. <https://doi.org/10.1128/aem.62.10.3557-3559.1996>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2)
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., & Stahl, D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1919-1925. <https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1919-1925.1990>

- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59(1), 143-169. <https://doi.org/doi:10.1128/mr.59.1.143-169.1995>
- Anderson, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, 26(1), 32-46.
- Anderson, O. R. (1992). Laybourn-Parry, J. 1992. Protozoan Plankton Ecology. Chapman & Hall, New York. ISBN 0-412-34440-8. 231 pp.£ 99.00. *The Journal of Protozoology*, 39(6), 740-741.
- Annavajhala, M. K., Kapoor, V., Santo-Domingo, J., & Chandran, K. (2018). Comammox functionality identified in diverse engineered biological wastewater treatment systems. *Environmental Science & Technology Letters*, 5(2), 110-116.
- Antunes, L. C. M., Ferreira, R. B., Buckner, M. M., & Finlay, B. B. (2010). Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology*, 156(8), 2271-2282.
- Aonofriesei, F., & Petrosanu, M. (2007). Activated sludge bulking episodes and dominant filamentous bacteria at waste water treatment plant Constanța Sud (Romania). *Proceedings of the Romanian Academy, Series B*, 83-87.
- APHA. (1992). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (18th ed.). American Public Health Association.
- Aravinthan, V., Mino, T., Takizawa, S., Satoh, H., & Matsuo, T. (2001). Sludge hydrolysate as a carbon source for denitrification. *Water Science & Technology*, 43(1), 191-199.
- Arden, E., & Lockett, W. (1914). Experiments on the oxidation of sewage without the aid of filters. Part II. *J Soc Chem Ind*, 33, 1122-1132.
- Arévalo, J., Moreno, B., Pérez, J., & Gómez, M. (2009). Applicability of the Sludge Biotic Index (SBI) for MBR activated sludge control. *Journal of Hazardous Materials*, 167(1-3), 784-789.
- Arregui, L., Liébana, R., Calvo, P., Pérez-Uz, B., Salvadó, H., & Serrano, S. (2013). Bioindication in activated sludge wastewater treatment plants. In *Handbook of wastewater treatment* (pp. 277-291). Nova Science Publishers Hauppauge, New York;.
- Arregui, L., Liébana, R., Rodríguez, E., Murciano, A., Conejero, F., Pérez-Uz, B., & Serrano, S. (2012). Analysis of the usefulness of biological parameters for the control of activated sludge wastewater treatment plants in an interlaboratory study context. *Journal of Environmental Monitoring*, 14(5), 1444-1452.
- Arregui, L., Linares, M., Pérez-Uz, B., Guinea, A., & Serrano, S. (2008). Involvement of crawling and attached ciliates in the aggregation of particles in wastewater treatment plants. *Air, Soil and Water Research*, 1, ASWR. S752.

- Arregui, L., Pérez-Uz, B., Calvo, P., Salvadó, H., Fernández, N., Rodríguez, E., . . . Serrano, S. (2009). *Characterization of protist communities in different ranges of nitrogenous removal*.
- Arregui, L., Pérez-Uz, B., Zornoza, A., & Serrano, S. (2010). A New Species of the Genus *Metacystis* (Ciliophora, Prostomatida, Metacystidae) from a Wastewater Treatment Plant. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 57(4), 362-368. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2010.00484.x>
- Arregui, L., Serrano, S., Linares, M., Pérez-Uz, B., & Guinea, A. (2007). Ciliate contributions to bioaggregation: laboratory assays with axenic cultures of *Tetrahymena thermophila*. *International Microbiology*, 10(2), 91.
- Bae, T.-H., & Tak, T. M. (2005). Interpretation of fouling characteristics of ultrafiltration membranes during the filtration of membrane bioreactor mixed liquor. *Journal of Membrane Science - J MEMBRANE SCI*, 264, 151-160. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2005.04.037>
- Baeten, J. E., van Loosdrecht, M. C., & Volcke, E. I. (2020). When and why do gradients of the gas phase composition and pressure affect liquid-gas transfer? *Water Research*, 178, 115844.
- Baptista, J. D., Lunn, M., Davenport, R. J., Swan, D. L., Read, L. F., Brown, M. R., . . . Curtis, T. P. (2014). Agreement between amoA gene-specific quantitative PCR and fluorescence in situ hybridization in the measurement of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(19), 5901-5910. <https://doi.org/10.1128/aem.01383-14>
- Barnard, A. M., Bowden, S. D., Burr, T., Coulthurst, S. J., Monson, R. E., & Salmond, G. P. (2007). Quorum sensing, virulence and secondary metabolite production in plant soft-rotting bacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 362(1483), 1165-1183. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2042>
- Barrero-Canosa, J., Moraru, C., Zeugner, L., Fuchs, B. M., & Amann, R. (2017). Direct-geneFISH: a simplified protocol for the simultaneous detection and quantification of genes and rRNA in microorganisms. *Environmental Microbiology*, 19(1), 70-82. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1462-2920.13432>
- Bartelme, R. P., McLellan, S. L., & Newton, R. J. (2017). Freshwater recirculating aquaculture system operations drive biofilter bacterial community shifts around a stable nitrifying consortium of ammonia-oxidizing archaea and comammox *Nitrospira*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 101.
- Bastian, M., Heymann, S., & Jacomy, M. (2009). Gephi: an open source software for exploring and manipulating networks. Third international AAAI conference on weblogs and social media,

- Bellassi, P., Cappa, F., Fontana, A., & Morelli, L. (2020). Phenotypic and Genotypic Investigation of Two Representative Strains of Microbacterium Species Isolated From Micro-Filtered Milk: Growth Capacity and Spoilage-Potential Assessment. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 554178-554178. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.554178>
- Berger, H., Foissner, W., & Kohmann, F. (1997). *Bestimmung und Ökologie der Mikrosaprobien nach DIN 38410: 26 Bildbestimmungsschlüssel, 10 Tabellen*. Fischer.
- Berninger, U. G., Finlay, B. J., & Kuuppo-Leinikki, P. (1991). Protozoan control of bacterial abundances in freshwater. *Limnology and Oceanography*, *36*(1), 139-147.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis I: the mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *62*(3), 293-300.
- Bitton, G. (1994). *Wastewater Microbiology* (3rd ed.). John Wiley and Sons, Inc., Publications.
- Bitton, G. (2002). Encyclopedia of Environmental Microbiology. *Wiley International Publication*, *4*, 2605–2612.
- Blosser, R. S., & Gray, K. M. (2000). Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers. *Journal of Microbiological Methods*, *40*(1), 47-55.
- Bluegold. (2020). *Biorreactor de membranas MBR: Descripción y su aplicación al tratamiento de aguas residuales*. <https://www.bluegold.es/biorreactores-de-membrana-mbr-descripcion-y-aplicacion/>
- Bokulich, N. A., Kaehler, B. D., Rideout, J. R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., . . . Caporaso, J. G. (2018). Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*, *6*(1), 1-17.
- Bray, J. R., & Curtis, J. T. (1957). An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, *27*(4), 326-349.
- Buitrón Méndez, G., Reino Sánchez, C., & Carrera Muyo, J. (2018). Manual técnico sobre tecnologías biológicas aerobias aplicadas al tratamiento de aguas residuales industriales. In: Programa CYTED (Ciencia y tecnología para el desarrollo).
- Burmølle, M., Ren, D., Bjarnsholt, T., & Sørensen, S. J. (2014). Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? *Trends in Microbiology*, *22*(2), 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.12.004>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, *13*(7), 581-583.

- Camejo, P. Y., Santo Domingo, J., McMahon, K. D., & Noguera, D. R. (2017). Genome-enabled insights into the ecophysiology of the comammox bacterium “Candidatus Nitrospira nitrosa”. *Msystems*, 2(5), e00059-00017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5596200/pdf/mSystems.00059-17.pdf>
- Campa, V. (2017). Análisis de imágenes de microscopía con ImageJ. *Createspace independiente*.
- Cárcamo-Oyarce, G., Lumjiaktase, P., Kümmerli, R., & Eberl, L. (2015). Quorum sensing triggers the stochastic escape of individual cells from *Pseudomonas putida* biofilms. *Nature communications*, 6(1), 1-9.
- Caron, D. A., Worden, A. Z., Countway, P. D., Demir, E., & Heidelberg, K. B. (2009). Protists are microbes too: a perspective. *Isme j*, 3(1), 4-12.
- CdYII. (2022). Saneamiento. <https://www.canaldeisabelsegunda.es/es/saneamiento>
- Ceri, H., Olson, M., Stremick, C., Read, R., Morck, D., & Buret, A. (1999). The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1771-1776.
- Chaffron, S., Rehrauer, H., Pernthaler, J., & Von Mering, C. (2010). A global network of coexisting microbes from environmental and whole-genome sequence data. *Genome Research*, 20(7), 947-959.
- Chan, A., Naphtali, J., & Schellhorn, H. E. (2019). High-throughput DNA sequencing technologies for water and wastewater analysis. *Science progress*, 102(4), 351-376.
- Chang, I. S., & Judd, S. J. (2002). Air sparging of a submerged MBR for municipal wastewater treatment. *Process Biochemistry*, 37(8), 915-920.
- Chang, I. S., Le Clech, P., Jefferson, B., & Judd, S. (2002). Membrane Fouling in Membrane Bioreactors for Wastewater Treatment. *Journal of Environmental Engineering*, 128(11), 1018-1029.
- Chen, J., Bittinger, K., Charlson, E. S., Hoffmann, C., Lewis, J., Wu, G. D., . . . Li, H. (2012). Associating microbiome composition with environmental covariates using generalized UniFrac distances. *Bioinformatics*, 28(16), 2106-2113.
- Christensen, G., Simpson, W., Younger, J., Baddour, L., Barrett, F., Melton, D., & Beachey, E. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(6), 996-1006.
- Clarke, K. R. (1993). Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*, 18(1), 117-143.

- Clarke, K. R., Gorley, R., Somerfield, P. J., & Warwick, R. (2014). Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation.
- Clarke, K. R., & Warwick, R. (2001). Change in marine communities. *An approach to statistical analysis and interpretation*, 2, 1-168.
- Clesceri, L. S., Greenberg, A. E., Trussell, R. R., American Public Health, A., American Water Works, A., & Water Pollution Control, F. (1989). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (17th ed.). American Public Health Association.
- Cotto, I., Dai, Z., Huo, L., Anderson, C. L., Vilardi, K. J., Ijaz, U., . . . Pinto, A. J. (2020). Long solids retention times and attached growth phase favor prevalence of comammox bacteria in nitrogen removal systems. *Water Research*, 169, 115268. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115268>
- Curds, C. (1968). An experimental study of the role the ciliated protozoa in the activated-sludge process. *Wat. Pollut. Control*, 67, 312-329.
- Curds, C., & Cockburn, A. (1970a). Protozoa in biological sewage-treatment processes—I. A survey of the protozoan fauna of British percolating filters and activated-sludge plants. *Water Research*, 4(3), 225-236.
- Curds, C., & Cockburn, A. (1970b). Protozoa in biological sewage-treatment processes—II. Protozoa as indicators in the activated-sludge process. *Water Research*, 4(3), 237-249.
- Curds, C. R. (1982). The ecology and role of protozoa in aerobic sewage treatment processes. *Annual Reviews in Microbiology*, 36(1), 27-28.
- Curds, C. R. (1992). *Protozoa and the water industry*. cambridge university press.
- Cydzik-Kwiatkowska, A., & Zielińska, M. (2016). Bacterial communities in full-scale wastewater treatment systems. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 32(4), 66. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2012-9>
- Cydzik-Kwiatkowska, A., Zielińska, M., & Wojnowska-Batyia, I. (2012). Impact of operational parameters on bacterial community in a full-scale municipal wastewater treatment plant. *Polish Journal of Microbiology*, 61(1), 41.
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K. H., & Wagner, M. (1999). The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology*, 22(3), 434-444. [https://doi.org/10.1016/s0723-2020\(99\)80053-8](https://doi.org/10.1016/s0723-2020(99)80053-8)
- Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., . . . Wagner, M. (2015). Complete nitrification by Nitrospira bacteria. *Nature*, 528(7583), 504-509. <https://doi.org/10.1038/nature16461>

- Daims, H., Lücker, S., & Wagner, M. (2016). A New Perspective on Microbes Formerly Known as Nitrite-Oxidizing Bacteria. *Trends in Microbiology*, 24(9), 699-712. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.05.004>
- Daims, H., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H., Schleifer, K.-H., & Wagner, M. (2001). In Situ Characterization of Nitrospira-Like Nitrite-Oxidizing Bacteria Active in Wastewater Treatment Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), 5273-5284. <https://doi.org/doi:10.1128/AEM.67.11.5273-5284.2001>
- Daims, H., & Wagner, M. (2010). The microbiology of nitrogen removal. In R. J. Seviour & P. H. Nielsen (Eds.), *The microbiology of activated sludge* (pp. 259-280). IWA Publishing.
- Daniel, W. W., & Cross, C. L. (2018). *Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences*. Wiley.
- de Celis, M., Belda, I., Ortiz-Álvarez, R., Arregui, L., Marquina, D., Serrano, S., & Santos, A. (2020). Tuning up microbiome analysis to monitor WWTPs' biological reactors functioning. *Scientific Reports*, 10(1), 1-8.
- de Celis, M., Duque, J., Marquina, D., Salvadó, H., Serrano, S., Arregui, L., . . . Belda, I. (2022). Niche differentiation drives microbial community assembly and succession in full-scale activated sludge bioreactors. *NPJ biofilms and microbiomes*, 8(1), 23. <https://doi.org/10.1038/s41522-022-00291-2>
- de Celis, M., Serrano-Aguirre, L., Belda, I., Liébana-García, R., Arroyo, M., Marquina, D., . . . Santos, A. (2021). Acylase enzymes disrupting quorum sensing alter the transcriptome and phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*, and the composition of bacterial biofilms from wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, 799, 149401. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149401>
- De Kievit, T. R., & Iglewski, B. H. (2000). Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infection and Immunity*, 68(9), 4839-4849. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC101676/pdf/ii004839.pdf>
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U., & Timmis, K. N. (1990). Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *Journal of Bacteriology*, 172(11), 6568-6572.
- de Vasconcelos, A. T. R., De Almeida, D. F., Hungria, M., Guimaraes, C. T., Antônio, R. V., Almeida, F. C., . . . Andrade, E. M. (2003). The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 11660-11665.
- Decamp, O., & Warren, A. (1998). Bacterivory in ciliates isolated from constructed wetlands (reed beds) used for wastewater treatment. *Water Research*, 32(7), 1989-1996.

- Declerck, N., Bouillaut, L., Chaix, D., Rugani, N., Slamti, L., Hoh, F., . . . Arold, S. T. (2007). Structure of PlcR: Insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(47), 18490-18495. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704501104>
- Deng, L., Guo, W., Ngo, H. H., Zhang, H., Wang, J., Li, J., . . . Wu, Y. (2016). Biofouling and control approaches in membrane bioreactors. *Bioresource Technology*, *221*, 656-665. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.105>
- Dewisme, E. (1997). Características de las aguas residuales. *XV Curso sobre Tratamiento de Aguas Residuales y Explotación de Estaciones Depuradoras*. CEDEX, Madrid.
- Di Marzio, W. (2002). First results from a screening of filamentous organisms present in Buenos Aires's activated sludge plants. *Water Science and Technology*, *46*(1-2), 119-122.
- Djordjevic, D., Wiedmann, M., & McLandsborough, L. (2002). Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(6), 2950-2958.
- Doll, E. V., Scherer, S., & Wenning, M. (2017). Spoilage of microfiltered and pasteurized extended shelf life milk is mainly induced by psychrotolerant spore-forming bacteria that often originate from recontamination. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 135.
- Doll, K., Jongstaphongpun, K. L., Stumpp, N. S., Winkel, A., & Stiesch, M. (2016). Quantifying implant-associated biofilms: Comparison of microscopic, microbiologic and biochemical methods. *Journal of Microbiological Methods*, *130*, 61-68.
- Doménech, J. (2003). Depuración y potabilización del agua. *Elsevier*, *22*(8), 110-116.
- dos Santos, L. A., Ferreira, V., Pereira, M. O., & Nicolau, A. (2014). Relationship between protozoan and metazoan communities and operation and performance parameters in a textile sewage activated sludge system. *European Journal of Protistology*, *50*(4), 319-328.
- Douterelo, I., Dutilh, B. E., Arkhipova, K., Calero, C., & Husband, S. (2020). Microbial diversity, ecological networks and functional traits associated to materials used in drinking water distribution systems. *Water Research*, *173*, 115586. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115586>
- Droste, R. L., & Gehr, R. L. (2018). *Theory and practice of water and wastewater treatment*. John Wiley & Sons.
- Drysdale, G. D., Kasan, H. C., & Bux, F. (2001). Assessment of denitrification by the ordinary heterotrophic organisms in an NDBEPR activated sludge system. *Water Science and Technology*, *43*(1), 147-154. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0036>

- Drzewicki, A., & Kulikowska, D. (2011). Limitation of sludge biotic index application for control of a wastewater treatment plant working with shock organic and ammonium loadings. *European Journal of Protistology*, 47(4), 287-294.
- Dubber, D., & Gray, N. (2011). The influence of fundamental design parameters on ciliates community structure in Irish activated sludge systems. *European Journal of Protistology*, 47(4), 274-286.
- Dubber, D., & Gray, N. F. (2009). Enumeration of protozoan ciliates in activated sludge: determination of replicate number using probability. *Water Research*, 43(14), 3443-3452. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.05.006>
- Dueholm, M. S., Nierychlo, M., Andersen, K. S., Rudkjøbing, V., Knutsson, S., Albertsen, M., . . . Consortium, M. G. (2021). MiDAS 4: A global catalogue of full-length 16S rRNA gene sequences and taxonomy for studies of bacterial communities in wastewater treatment plants. *bioRxiv*.
- Dufrene, M., & Legendre, P. (1997). Species Assemblages and Indicator Species: The Need for a Flexible Asymmetrical Approach. *Ecological Monographs*, 67, 345-366. <https://doi.org/10.2307/2963459>
- Eberhard, A. (1972). Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *Journal of Bacteriology*, 109(3), 1101-1105.
- Edgar, R. C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 10(10), 996-998.
- Edgar, R. C. (2018). Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs. *Bioinformatics*, 34(14), 2371-2375. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty113>
- Emaya. (2018). *Manual para operador de planta* (V03 ed.).
- EPA. (1998). *How Wastewater Treatment Works... The Basics*. Environmental Protection Agency, Office of Water (4204)
- Eriksson, L., & Alm, B. (1991). Study of flocculation mechanisms by observing effects of a complexing agent on activated sludge properties. *Water Science and Technology*, 24(7), 21-28.
- Esteban, G., Téllez, C., & Bautista, L. M. (1991). Dynamics of ciliated protozoa communities in activated-sludge process. *Water Research*, 25(8), 967-972.
- Extremina, C., Costa, L., Aguiar, A., Peixe, L., & Fonseca, A. (2011). Optimization of processing conditions for the quantification of enterococci biofilms using microtitre-plates. *Journal of Microbiological Methods*, 84(2), 167-173.

- Fenchel, T., & Finlay, B. J. (2004). The ubiquity of small species: patterns of local and global diversity. *Bioscience*, 54(8), 777-784.
- Fernández-Galiano, D., Guinea, A., & Serrano, S. (1996). *Guía práctica de identificación de protozoos ciliados en estaciones depuradoras de aguas residuales por lodos activos de la Comunidad Autónoma de Madrid*.
- Fiencke, C., & Bock, E. (2004). Genera-Specific Immunofluorescence Labeling of Ammonia Oxidizers with Polyclonal Antibodies Recognizing Both Subunits of the Ammonia Monooxygenase. *Microbial Ecology*, 47(4), 374-384. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-1009-8>
- Finocchiaro, G., & Cingolani, C. (1995). Indagine sull'efficienza di un impianto di depurazione a fanghi attivi utilità delle informazioni biologiche. *Biologi Italiani*, XXV, 39-44.
- Fisher, R. A. (1930). *The Genetical Theory of Natural Selection*. Clarendon Press.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563-575.
- Flemming, H. C. (2020). Biofouling and me: My Stockholm syndrome with biofilms. *Water Research*, 173, 115576. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115576>
- Foissner, W. (2006). Biogeography and dispersal of micro-organisms: a review emphasizing protists. *Acta Protozoologica*, 45(2), 111-136.
- Foissner, W. (2016). Protists as bioindicators in activated sludge: Identification, ecology and future needs. *European Journal of Protistology*, 55, 75-94.
- Foissner, W., Berger, H., Blatterer, H., & Kohmann, F. (1995). *Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems, Band IV: Gymnostomatea, Loxodes, Suctoria* (Vol. 1/95).
- Foissner, W., Berger, H., & Kohmann, F. (1992). *Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems. Band II: Peritrichia, Heterotrichida, Odontostomatida*.
- Foissner, W., Blatterer, H., Berger, H., & Kohmann, F. (1991a). *Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems-Band 1: Cyrtophorida, Oligotrichida, Hypotrichia, Colpodea. I Informationsberichte des Bayer* (Vol. 1/91).
- Foissner, W., Blatterer, H., Berger, H., & Kohmann, F. (1991b). *Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems – Band III* (Vol. 1/91).
- Forster, S., Snape, J., Lappin-Scott, H., & Porter, J. (2002). Simultaneous Fluorescent Gram Staining and Activity Assessment of Activated Sludge Bacteria. *Applied and*

- Environmental Microbiology*, 68, 4772-4779.
<https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.4772-4779.2002>
- Fowler, S. J., Palomo, A., Dechesne, A., Mines, P. D., & Smets, B. F. (2018). Comammox Nitrospira are abundant ammonia oxidizers in diverse groundwater-fed rapid sand filter communities. *Environmental Microbiology*, 20(3), 1002-1015.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1462-2920.14033>
- Francis, C. A., Roberts, K. J., Beman, J. M., Santoro, A. E., & Oakley, B. B. (2005). Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(41), 14683-14688.
- Fuqua, C., Parsek, M. R., & Greenberg, E. P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone *Quorum Sensing*. *Annual Review of Genetics*, 35(1), 439-468. <https://doi.org/doi:10.1146/annurev.genet.35.102401.090913>
- Fuqua, W. C., Winans, S. C., & Greenberg, E. P. (1994). *Quorum sensing* in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176(2), 269-275.
- für Wasserwirtschaft, B. L. (1999). Das mikroskopische Bild bei der biologischen Abwasserreinigung. *Erweiterte und überarbeitete Auflage, Degendorf*, 12.
- Ganner, B., Unterweger, A., & Jäger, P. (2002). *Die Biologie der Salzburger Kläranlagen im Zeitraum von 1991 bis 2000. Zur Evaluation der Beurteilungskriterien bei der mikroskopischen Belebtschlammuntersuchung kommunaler Kläranlagen mit Stickstoffelimination* (Vol. 6). Amt der Salzburger Landesregierung.
- Gao, J.-F., Luo, X., Wu, G.-X., Li, T., & Peng, Y.-Z. (2013). Quantitative analyses of the composition and abundance of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria in eight full-scale biological wastewater treatment plants. *Bioresource Technology*, 138, 285-296.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.176>
- Gao, J., Luo, X., Wu, G., Li, T., & Peng, Y. (2014). Abundance and diversity based on amoA genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in ten wastewater treatment systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(7), 3339-3354.
- Gao, P., Xu, W., Sontag, P., Li, X., Xue, G., Liu, T., & Sun, W. (2016). Correlating microbial community compositions with environmental factors in activated sludge from four full-scale municipal wastewater treatment plants in Shanghai, China. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(10), 4663-4673. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7307-0>
- García Cascales, M. S. (2009). Métodos para la comparación de alternativas mediante un Sistema de Ayuda a la Decisión SAD y “Soft Computing”.

- García Gómez, F. (2017). Análisis estadístico multivariante de los potenciales evocados de onda P3b en las señales EEG registradas durante la realización de una tarea auditiva para el estudio en el diagnóstico de la esquizofrenia.
- Garduño Rivera, R., Ibarra Olivo, J. E., & Dávila Bugarín, R. (2013). La medición de la competitividad en México: ventajas y desventajas de los indicadores. *Realidad, datos y espacio. Revista Internacional de Estadística y Geografía*, 4(3), 28-53.
- Garner, E., Davis, B. C., Milligan, E., Blair, M. F., Keenum, I., Maile-Moskowitz, A., . . . Pruden, A. (2021). Next generation sequencing approaches to evaluate water and wastewater quality. *Water Research*, 194, 116907. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116907>
- González-Martínez, A., Rodríguez-Sánchez, A., van Loosdrecht, M. C. M., González-López, J., & Vahala, R. (2016). Detection of comammox bacteria in full-scale wastewater treatment bioreactors using tag-454-pyrosequencing. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(24), 25501-25511. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7914-4>
- Goujon, M., McWilliam, H., Li, W., Valentin, F., Squizzato, S., Paern, J., & Lopez, R. (2010). A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL–EBI. *Nucleic Acids Research*, 38(suppl_2), W695-W699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq313>
- Gram, C. (1884). Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschritte der Medicin*, 2, 185-189.
- Greenacre, M. (2008). *La práctica del análisis de correspondencias*. Fundación BBVA.
- Greenberg, E. P. (1997). Quorum sensing in gramnegative bacteria. *ASM news*, 63, 371-377.
- Gwak, J.-H., Jung, M.-Y., Hong, H., Kim, J.-G., Quan, Z.-X., Reinfelder, J. R., . . . Rhee, S.-K. (2020). Archaeal nitrification is constrained by copper complexation with organic matter in municipal wastewater treatment plants. *Isme j*, 14(2), 335-346. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0538-1>
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*,
- Hammer, Ø., Harper, D. A., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4(1), 9.
- Han, P., Yu, Y., Zhou, L., Tian, Z., Li, Z., Hou, L., . . . Men, Y. (2019). Specific micropollutant biotransformation pattern by the comammox bacterium *Nitrospira inopinata*. *Environmental Science & Technology*, 53(15), 8695-8705.
- Hatzenpichler, R. (2012). Diversity, physiology, and niche differentiation of ammonia-oxidizing archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(21), 7501-7510.

- Hausmann, K., Hülsmann, N., & Radek, R. (2004). Protistology. *Acta Protozoologica*, 43, 89-90.
- Hayek, L., & Buzas, M. (1997). *Surveying natural populations* Columbia University Press New York.
- Hernández, A. (1992). *Depuración de aguas residuales* (2 ed.). Colegio de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos/ Servicio de Publicaciones de la Escuela de Ingenieros de Caminos de Madrid (U.P.M.).
- Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., . . . Legler, T. C. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical Chemistry*, 83(22), 8604-8610.
- Hindson, C. M., Chevillet, J. R., Briggs, H. A., Gallichotte, E. N., Ruf, I. K., Hindson, B. J., . . . Tewari, M. (2013). Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nature Methods*, 10(10), 1003-1005.
- Hong, P.-N., Taing, C., Phan, P.-T., & Honda, R. (2018). Polarity-Molecular Weight Profile of Extracellular Polymeric Substances in a Membrane Bioreactor: Comparison between Bulk Sludge and Cake Layers. *Journal of Water and Environment Technology*, 16, 40-53. <https://doi.org/10.2965/jwet.17-020>
- Horan, N. J. (1993). *Biological wastewater treatment systems: theory and operation*. John Wiley & Sons, New York. 1990. 310.
- Hu, B., Qi, R., & Yang, M. (2013). Systematic analysis of microfauna indicator values for treatment performance in a full-scale municipal wastewater treatment plant. *Journal of Environmental Sciences*, 25(7), 1379-1385.
- Hu, M., Wang, X., Wen, X., & Xia, Y. (2012). Microbial community structures in different wastewater treatment plants as revealed by 454-pyrosequencing analysis. *Bioresource Technology*, 117, 72-79. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.061>
- Huang, H., Peng, C., Peng, P., Lin, Y., Zhang, X., & Ren, H. (2019). Towards the biofilm characterization and regulation in biological wastewater treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(3), 1115-1129.
- Huang, Z., Gedalanga, P. B., Asvapathanagul, P., & Olson, B. H. (2010). Influence of physicochemical and operational parameters on Nitrobacter and Nitrospira communities in an aerobic activated sludge bioreactor. *Water Research*, 44(15), 4351-4358.
- Hwang, B.-K., Lee, C.-H., Chang, I.-S., Drews, A., & Field, R. (2012). Membrane bioreactor: TMP rise and characterization of bio-cake structure using CLSM-image analysis. *Journal of Membrane Science*, 419, 33-41.

- Iorhemen, O. T., Hamza, R. A., & Tay, J. H. (2016). Membrane Bioreactor (MBR) Technology for Wastewater Treatment and Reclamation: Membrane Fouling. *Membranes*, 6(2), 33. <https://doi.org/10.3390/membranes6020033>
- Isac, L., Rodríguez, E., Gómez, E., Salas, D., Jiménez, C., Fernández, N., & Horra, J. M. d. I. (2001). Sistema rápido de estimación de los rendimientos en depuración de una E.D.A.R. en función de las características macroscópicas y microscópicas del fango activado. *Tecnología del Agua*, 216, 40-44.
- Isazadeh, S., Jauffur, S., & Frigon, D. (2016). Bacterial community assembly in activated sludge: mapping beta diversity across environmental variables. *Microbiologyopen*, 5(6), 1050-1060. <https://doi.org/10.1002/mbo3.388>
- Ivnitsky, H., Katz, I., Minz, D., Volvovic, G., Shimoni, E., Kesselman, E., . . . Dosoretz, C. G. (2007). Bacterial community composition and structure of biofilms developing on nanofiltration membranes applied to wastewater treatment. *Water Research*, 41(17), 3924-3935. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.05.021>
- James, F. C., & McCulloch, C. E. (1990). Multivariate analysis in ecology and systematics: panacea or Pandora's box? *Annual Review of Ecology and Systematics*, 21(1), 129-166.
- Jenkins, D., Richard, M. G., & Daigger, G. T. (2003). *Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming, and other solids separation problems*. Crc Press.
- Jezbera, J., Horňák, K., & Šimek, K. (2005). Food selection by bacterivorous protists: insight from the analysis of the food vacuole content by means of fluorescence in situ hybridization. *FEMS Microbiology Ecology*, 52(3), 351-363.
- Jiang, R., Wang, J.-G., Zhu, T., Zou, B., Wang, D.-Q., Rhee, S.-K., . . . Quan, Z.-X. (2020). Use of newly designed primers for quantification of complete ammonia-oxidizing (comammox) bacterial clades and strict nitrite oxidizers in the genus *Nitrospira*. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(20), e01775-01720.
- Jiménez, C. F., N.; de la Horra, J. M.; Rodríguez, E.; Isac, L.; Salas, D. & Gómez, E. (2001). Sistema rápido de los rendimientos en depuración de una EDAR en función de las características macroscópicas y microscópicas del fango activado. *Tecnología del agua*, 216, 40-44, Article 21.
- Ju, F., Guo, F., Ye, L., Xia, Y., & Zhang, T. (2014). Metagenomic analysis on seasonal microbial variations of activated sludge from a full-scale wastewater treatment plant over 4 years. *Environmental Microbiology Reports*, 6(1), 80-89.
- Judd, S. (2011). *The MBR book: principles and applications of membrane bioreactors for water and wastewater treatment* (second ed.). Elsevier, London.
- Jürgens, K., & Matz, C. (2002). Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1), 413-434.

- Kalinowska, A., Pierpaoli, M., Jankowska, K., Fudala-Ksiazek, S., Remiszewska-Skwarek, A., & Łuczkiwicz, A. (2022). Insights into the microbial community of treated wastewater, its year-round variability and impact on the receiver, using cultivation, microscopy and amplicon-based methods. *Science of the Total Environment*, 829, 154630. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154630>
- Kanagal-Shamanna, R. (2016). Digital PCR: Principles and Applications. *Methods in Molecular Biology*, 1392, 43-50. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3360-0_5
- Kim, M. K., Zhao, A., Wang, A., Brown, Z. Z., Muir, T. W., Stone, H. A., & Bassler, B. L. (2017). Surface-attached molecules control *Staphylococcus aureus* quorum sensing and biofilm development. *Nature microbiology*, 2(8), 1-12.
- Kim, Y. J., Park, J. H., & Seo, K. H. (2018). Presence of *Stenotrophomonas maltophilia* exhibiting high genetic similarity to clinical isolates in final effluents of pig farm wastewater treatment plants. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 221(2), 300-307. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.12.002>
- Kinner, N., & Curds, C. (1987). Development of protozoan and metazoan communities in rotating biological contactor biofilms. *Water Research*, 21(4), 481-490.
- Kits, K. D., Jung, M.-Y., Vierheilig, J., Pjevac, P., Sedlacek, C. J., Liu, S., . . . Wissel, H. (2019). Low yield and abiotic origin of N₂O formed by the complete nitrifier *Nitrospira inopinata*. *Nature communications*, 10(1), 1-12.
- Kits, K. D., Sedlacek, C. J., Lebedeva, E. V., Han, P., Bulaev, A., Pjevac, P., . . . Wagner, M. (2017). Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle. *Nature*, 549(7671), 269-272. <https://doi.org/10.1038/nature23679>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1), e1-e1.
- Knobelsdorf, M. (2005). Eliminación biológica de nutrientes en un ARU de baja carga orgánica mediante el proceso VIP. *Doctorado en Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Barcelona, Universitat Politècnica de Catalunya*.
- Könneke, M., Bernhard, A. E., de La Torre, J. R., Walker, C. B., Waterbury, J. B., & Stahl, D. A. (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 437(7058), 543-546.
- Kraume, M., & Drews, A. (2010). Membrane bioreactors in waste water treatment—status and trends. *Chemical engineering & technology*, 33(8), 1251-1259.
- Krueger, C., & Sheikh, W. (1987). A new selective medium for isolating *Pseudomonas* spp. from water. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(4), 895-897.

- Kruskal, J. B. (1964). Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. *Psychometrika*, 29(1), 1-27.
- Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American statistical Association*, 47(260), 583-621.
- Kumar, A., Alam, A., Rani, M., Ehtesham, N. Z., & Hasnain, S. E. (2017). Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 307(8), 481-489.
- Le-Clech, P. (2010). Membrane bioreactors and their uses in wastewater treatments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(6), 1253-1260. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2885-8>
- Le-Clech, P., Alvarez-Vazquez, H., Jefferson, B., & Judd, S. (2003). Fluid hydrodynamics in submerged and sidestream membrane bioreactors. *Water Science and Technology*, 48(3), 113-119.
- Le-Clech, P., Chen, V., & Fane, A. G. (2006). Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment. *Journal of Membrane Science*, 284, 17-53. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2006.08.019>
- Lebedeva, E. V., Alawi, M., Maixner, F., Jozsa, P.-G., Daims, H., & Spieck, E. (2008). Physiological and phylogenetic characterization of a novel lithoautotrophic nitrite-oxidizing bacterium, 'Candidatus Nitrospira bockiana'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(1), 242-250. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/ijs.0.65379-0>
- Lebedeva, E. V., Off, S., Zumbärgel, S., Kruse, M., Shagzhina, A., Lückner, S., . . . Spieck, E. (2011). Isolation and characterization of a moderately thermophilic nitrite-oxidizing bacterium from a geothermal spring. *FEMS Microbiology Ecology*, 75(2), 195-204.
- Lee, N. M. (1996). Parameters affecting microorganisms and the process performance in biological wastewater treatment.
- Lee, S., Basu, S., Tyler, C. W., & Wei, I. W. (2004). Ciliate populations as bio-indicators at Deer Island Treatment Plant. *Advances in Environmental Research*, 8(3-4), 371-378.
- Legendre, P. (2008). Studying beta diversity: ecological variation partitioning by multiple regression and canonical analysis. *Journal of Plant Ecology*, 1(1), 3-8.
- Legendre, P., Borcard, D., & Peres-Neto, P. R. (2005). Analyzing beta diversity: partitioning the spatial variation of community composition data. *Ecological Monographs*, 75(4), 435-450. <https://doi.org/10.1890/05-0549>
- Legendre, P., & Legendre, L. (1998). *Numerical Ecology*, 3rd English ed.

- Li, X. F., Zhang, L. N., & Du, G. C. (2010). Influence of sludge discharge on sludge settleability and membrane flux in a membrane bioreactor. *Environmental Technology*, 31(11), 1289-1294.
- Liao, B., Allen, D., Droppo, I., Leppard, G., & Liss, S. (2001). Surface properties of sludge and their role in bioflocculation and settleability. *Water Research*, 35(2), 339-350.
- Lichstein, H. C., & Van De Sand, V. F. (1945). Violacein, an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *The Journal of Infectious Diseases*, 76(1), 47-51.
- Liébana, R., Arregui, L., Belda, I., Gamella, L., Santos, A., Marquina, D., & Serrano, S. (2015). Membrane bioreactor wastewater treatment plants reveal diverse yeast and protist communities of potential significance in biofouling. *Biofouling*, 31(1), 71-82. <https://doi.org/10.1080/08927014.2014.998206>
- Liébana, R., Arregui, L., Santos, A., Murciano, A., Marquina, D., & Serrano, S. (2016). Unravelling the interactions among microbial populations found in activated sludge during biofilm formation. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(9). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw134>
- Liebmann, H. (1936). Die Ciliatenfauna der Emscherbrunnen. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, 118(5), 555-573.
- Liebmann, H. (1951). *Handbuch der Frischwasser- und Abwasserbiologie. Biologie des Trinkwassers, Badewassers, Fischwassers, Vorfluters und Abwassers* (Vol. I).
- Lim, S., Kim, S., Yeon, K.-M., Sang, B.-I., Chun, J., & Lee, C.-H. (2012). Correlation between microbial community structure and biofouling in a laboratory scale membrane bioreactor with synthetic wastewater. *Desalination*, 287, 209-215.
- Limpiyakorn, T., Sonthiphand, P., Rongsayamanont, C., & Polprasert, C. (2011). Abundance of amoA genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in activated sludge of full-scale wastewater treatment plants. *Bioresource Technology*, 102(4), 3694-3701.
- Liu, J., Yang, M., Qi, R., An, W., & Zhou, J. (2008). Comparative study of protozoan communities in full-scale MWTPs in Beijing related to treatment processes. *Water Research*, 42(8-9), 1907-1918.
- Liu, S., Wang, H., Chen, L., Wang, J., Zheng, M., Liu, S., . . . Ni, J. (2020). Comammox *Nitrospira* within the Yangtze River continuum: community, biogeography, and ecological drivers. *Isme j*, 14(10), 2488-2504.
- Loy, A., Daims, H., & Wagner, M. (2002). Activated sludge: molecular techniques for determining community composition. *The encyclopedia of environmental microbiology*. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, 26-43.

- Lu, L., Hu, W., Tian, Z., Yuan, D., Yi, G., Zhou, Y., . . . Li, M. (2019). Developing natural products as potential anti-biofilm agents. *Chinese Medicine*, *14*(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s13020-019-0232-2>
- Lücker, S., Nowka, B., Rattei, T., Spieck, E., & Daims, H. (2013). The genome of *Nitrospina gracilis* illuminates the metabolism and evolution of the major marine nitrite oxidizer. *Frontiers in Microbiology*, *4*, 27.
- Lücker, S., Schwarz, J., Gruber-Dorninger, C., Spieck, E., Wagner, M., & Daims, H. (2015). Nitrotoga-like bacteria are previously unrecognized key nitrite oxidizers in full-scale wastewater treatment plants. *Isme j*, *9*(3), 708-720.
- Lücker, S., Wagner, M., Maixner, F., Pelletier, E., Koch, H., Vacherie, B., . . . Le Paslier, D. (2010). A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(30), 13479-13484.
- Lugo González, D. A., Aguilar, V. H., Casotto, M., Laurentin, A., & Gómez, A. (2013). Aplicabilidad de estadística multivariada para estudios nutricionales: bioensayo con el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae* L). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, *63*(3), 232-239.
- Lukumbuzya, M., Kristensen, J. M., Kitzinger, K., Pommerening-Röser, A., Nielsen, P. H., Wagner, M., . . . Pjevac, P. (2020). A refined set of rRNA-targeted oligonucleotide probes for in situ detection and quantification of ammonia-oxidizing bacteria. *Water Research*, *186*, 116372. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116372>
- Luna-Pabello, V., Mayén, R., Olvera-Viascan, V., Saavedra, J., & de Bazúa, C. D. (1990). Ciliated protozoa as indicators of a wastewater treatment system performance. *Biological wastes*, *32*(2), 81-90.
- Luo, J., Lv, P., Zhang, J., Fane, A. G., McDougald, D., & Rice, S. A. (2017). Succession of biofilm communities responsible for biofouling of membrane bio-reactors (MBRs). *PloS One*, *12*(7), e0179855.
- Luo, J., Zhang, J., Tan, X., McDougald, D., Zhuang, G., Fane, A. G., . . . Rice, S. A. (2014). The correlation between biofilm biopolymer composition and membrane fouling in submerged membrane bioreactors. *Biofouling*, *30*(9), 1093-1110. <https://doi.org/10.1080/08927014.2014.971238>
- Luo, S., Peng, Y., Liu, Y., & Peng, Y. (2022). Research progress and prospects of complete ammonia oxidizing bacteria in wastewater treatment. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, *16*(9), 1-10.
- Madoni, P. (1988). *I protozoi ciliati nel controllo di efficienza dei fanghi attivi: Manuale di applicazione*. Centro italiano studi di biologia ambientale.

- Madoni, P. (1994). A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis. *Water Research*, 28(1), 67-75.
- Madoni, P. (2003). Protozoa as indicators of wastewater treatment efficiency. *The handbook of water and wastewater microbiology*. Academic Press, Amsterdam, 361-371.
- Madoni, P. (2004). Applicazione dell'indice biotico del fango (SBI) nel processo di depurazione a fanghi attivi. *Dip. Scienze naturali, Università degli studi, Parma*.
- Madoni, P. (2011). Protozoa in wastewater treatment processes: A minireview. *Italian Journal of Zoology*, 78(1), 3-11.
- Madoni, P., Davoli, D., & Chierici, E. (1993). Comparative analysis of the activated sludge microfauna in several sewage treatment works. *Water Research*, 27(9), 1485-1491.
- Madoni, P., & Ghetti, P. F. (1981). The structure of ciliated protozoa communities in biological sewage-treatment plants. *Hydrobiologia*, 83(2), 207-215.
- Madoni, P., & Sartore, F. (2003). Long-term changes in the structure of ciliate communities in a small isolated pond. *Italian Journal of Zoology*, 70(4), 313-320.
- Madsen, J. S., Sørensen, S. J., & Burmølle, M. (2018). Bacterial social interactions and the emergence of community-intrinsic properties. *Current Opinion in Microbiology*, 42, 104-109. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.11.018>
- Magurran, A. E. (1988). *Ecological diversity and its measurement*. Princeton university press.
- Márquez Rosales, H. (1999). Métodos matemáticos de evaluación de factores de riesgo para el Patrimonio Arqueológico: una aplicación Gis del método de jerarquías analíticas de TL Saaty. *Spal*, 6, 21-37.
- Martens-Habbena, W., Berube, P. M., Urakawa, H., de La Torre, J. R., & Stahl, D. A. (2009). Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. *Nature*, 461(7266), 976-979.
- Martín-Cereceda, M., Serrano, S., & Guinea, A. (1996). A comparative study of ciliated protozoa communities in activated-sludge plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 21(4), 267-276.
- Martín-Regalado, N. (2019). Detección de especies indicadoras de condiciones de hábitats. In (pp. 223-235).
- Martínez Ortega, R. M., Tuya Pendás, L. C., Martínez Ortega, M., Pérez Abreu, A., & Cánovas, A. M. (2009). El coeficiente de correlación de los rangos de Spearman, caracterización. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 8, 0-0.

- Matia, L., Martín, J., Ventura, F., & Campos, C. (1999). La qualitat dels recursos no convencionals. *Xarxa Temàtica: Recursos d'aigua*. (eds. M. Salgot, X. Sánchez y A. Torrens). *Fundación Agbar. Capítulo, 9*.
- McClellan, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., . . . Williams, P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology, 143* (Pt 12), 3703-3711. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-12-3703>
- McGeoch, M. A., & Chown, S. L. (1998). Scaling up the value of bioindicators. *Trends in Ecology & Evolution, 13*(2), 46-47. [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(97\)01279-2](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(97)01279-2)
- McIlroy, S., Saunders, A., Albertsen, M., Nierychlo, M., McIlroy, B., Hansen, A., . . . Nielsen, P. (2015). MiDAS: the field guide to the microbes of activated sludge. Database, bav062. In.
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One, 8*(4), e61217.
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2014). Waste not, want not: why rarefying microbiome data is inadmissible. *PLoS Computational Biology, 10*(4), e1003531.
- Meerburg, F. A., Vlaeminck, S. E., Roume, H., Seuntjens, D., Pieper, D. H., Jauregui, R., . . . Boon, N. (2016). High-rate activated sludge communities have a distinctly different structure compared to low-rate sludge communities, and are less sensitive towards environmental and operational variables. *Water Research, 100*, 137-145.
- Merritt, J. H., Kadouri, D. E., & O'Toole, G. A. (2011). Growing and analyzing static biofilms. *Curr Protoc Microbiol, 22*(1), 1B. 1.1-1B. 1.18.
- MITECO. (2022). *Informe de Inventario Nacional de Emisiones de Gases de Efecto Invernadero*. (NIPO: 665-22-007-08). Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. Secretaría General Técnica. Centro de Publicaciones
- Miura, Y., Hiraiwa, M. N., Ito, T., Itonaga, T., Watanabe, Y., & Okabe, S. (2007). Bacterial community structures in MBRs treating municipal wastewater: relationship between community stability and reactor performance. *Water Research, 41*(3), 627-637.
- Miyashiro, T., & Ruby, E. G. (2012). Shedding light on bioluminescence regulation in *Vibrio fischeri*. *Molecular Microbiology, 84*(5), 795-806.
- MOPA. (1996). *Real Decreto 509/1996, de 15 de marzo (BOE 29 de marzo), de desarrollo del Real Decreto-ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas*. Boletín Oficial del Estado
- Moreno, C. E. (2001). *Métodos para medir la biodiversidad* (Vol. 1). Manuales y Tesis SEA.

- Morishita, I. (1970). *Studies on the protozoa-populations in activated sludge of sewage and waste treatment plants* (Vol. 3).
- Morley, A. A. (2014). Digital PCR: A brief history. *Biomol Detect Quantif*, 1(1), 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2014.06.001>
- Morohoshi, T., Kato, M., Fukamachi, K., Kato, N., & Ikeda, T. (2008). N-Acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. *FEMS Microbiology Letters*, 279(1), 124-130. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.01016.x>
- Mossel, D., Mengerink, W., & Scholts, H. (1962). Use of a modified MacConkey agar medium for the selective growth and enumeration of Enterobacteriaceae. *Journal of Bacteriology*, 84(2), 381-381.
- Mou, X., Sun, S., Edwards, R. A., Hodson, R. E., & Moran, M. A. (2008). Bacterial carbon processing by generalist species in the coastal ocean. *Nature*, 451(7179), 708-711.
- Mujeriego, R. (1990). *Riego con agua residual municipal regenerada*. Universitat Politècnica de Catalunya Barcelona.
- Mußmann, M., Brito, I., Pitcher, A., Sinnighe Damsté, J. S., Hatzepichler, R., Richter, A., . . . Head, I. M. (2011). Thaumarchaeotes abundant in refinery nitrifying sludges express *amoA* but are not obligate autotrophic ammonia oxidizers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(40), 16771-16776. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.1106427108>
- Mutamim, N. S. A., Noor, Z. Z., Hassan, M. A. A., Yuniarto, A., & Olsson, G. (2013). Membrane bioreactor: applications and limitations in treating high strength industrial wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 225, 109-119.
- Muyima, N. Y., Momba, M. N. B., & Cloete, T. E. (1997). Biological methods for the treatment of wastewaters In *Microbial Community Analysis: The Key to the Design of Biological Wastewater Treatment Systems* Scientific and Technical Report, IAWQ.
- Nguyen, H.-H. T., Elliott, S. J., Yip, J. H.-K., & Chan, S. I. (1998). The particulate methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) is a novel copper-containing three-subunit enzyme: isolation and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 273(14), 7957-7966.
- Nicolau, A., Dias, N., Mota, M., & Lima, N. (2001). Trends in the use of protozoa in the assessment of wastewater treatment. *Research in Microbiology*, 152(7), 621-630.
- Nielsen, A. T., Liu, W. T., Filipe, C., Grady, L., Jr., Molin, S., & Stahl, D. A. (1999). Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 1251-1258.

- O'Loughlin, C. T., Miller, L. C., Siryaporn, A., Drescher, K., Semmelhack, M. F., & Bassler, B. L. (2013). A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(44), 17981-17986. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316981110>
- O'Malley, M. (2008). [] Everything is everywhere: but the environment selects': ubiquitous distribution and ecological determinism in microbial biogeography. *Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, *39*, 314-325. <https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2008.06.005>
- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*, *28*(3), 449-461. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x>
- Oksanen, J., Blanchet, F., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P., . . . Stevens, M. (2019). vegan: Community Ecology Package (R package Version 2.5-5) <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>. *Community ecology package*.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P., O'hara, R., . . . Wagner, H. (2017). Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.3-0; 2015. In.
- Olsson, U., Drasgow, F., & Dorans, N. J. (1982). The polyserial correlation coefficient. *Psychometrika*, *47*(3), 337-347.
- Onuki, M., Satoh, H., Mino, T., & Matsuo, T. (2000). Application of molecular methods to microbial community analysis of activated sludge. *Water Science and Technology*, *42*(3-4), 17-22.
- Palomo, A., Pedersen, A. G., Fowler, S. J., Dechesne, A., Sicheritz-Pontén, T., & Smets, B. F. (2018). Comparative genomics sheds light on niche differentiation and the evolutionary history of comammox Nitrospira. *Isme j*, *12*(7), 1779-1793.
- Pan, K.-L., Gao, J.-F., Fan, X.-Y., Li, D.-C., & Dai, H.-H. (2018). The more important role of archaea than bacteria in nitrification of wastewater treatment plants in cold season despite their numerical relationships. *Water Research*, *145*, 552-561.
- Papenfort, K., & Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(9), 576-588.
- Parada-Albarracín, J. A., Pérez, J., & Gómez, M. A. (2017). Bioindicator value of flagellates in urban wastewater treatment using membrane bioreactors. *Water Research*, *122*, 526-535. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.033>
- Park, H.-D., Wells, G. F., Bae, H., Criddle, C. S., & Francis, C. A. (2006). Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(8), 5643-5647.

- Parthasarathy, S., Jordan, L. D., Schwarting, N., Woods, M. A., Abdullahi, Z., Varahan, S., . . . Hancock, L. E. (2020). Involvement of Chromosomally Encoded Homologs of the RRNPP Protein Family in *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation and Urinary Tract Infection Pathogenesis. *Journal of Bacteriology*, 202(17). <https://doi.org/10.1128/jb.00063-20>
- Pawlowski, J., Lejzerowicz, F., Apotheloz-Perret-Gentil, L., Visco, J., & Esling, P. (2016). Protist metabarcoding and environmental biomonitoring: Time for change. *European Journal of Protistology*, 55(Pt A), 12-25. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2016.02.003>
- Peet, R. K. (1974). The measurement of species diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 5(1), 285-307.
- Perdomo, F., Vibrans, H., Romero, A., Domínguez, J. A., & Medina, J. L. (2004). Análisis de SHE, una herramienta para estudiar la diversidad de maleza. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 27(Es1), 57-61.
- Pérez-Uz, B., Arregui, L., Calvo, P., Salvadó, H., Fernández, N., Rodríguez, E., . . . Serrano, S. (2009). Efficiency of nitrogen removal and protist communities: the potential for introduction of novel biological index. Proceedings of the International Workshop on Integrated vision of urban and agro-industrial wastewater treatment, monitoring and reclamation: key role played by the Wastewater Treatment Plant. ISRIM/LIFE,
- Pérez-Uz, B., Arregui, L., Calvo, P., Salvadó, H., Fernández, N., Rodríguez, E., . . . Serrano, S. (2010). Assessment of plausible bioindicators for plant performance in advanced wastewater treatment systems. *Water Research*, 44(17), 5059-5069.
- Pérez-Uz, B., Serrano, S., Arregui, L., Calvo, P., & Guinea, A. (2008). Protozoos. *Identificación de Protistas en EDAR en Manual Práctico para el Estudio de Grupos Bioindicadores en Fangos Activos*. Madrid: Reed Bussisness Information-Tecnología del Agua, 42-53.
- Personnic, N., Striednig, B., & Hilbi, H. (2021). Quorum sensing controls persistence, resuscitation, and virulence of *Legionella* subpopulations in biofilms. *Isme j*, 15(1), 196-210. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00774-0>
- Pester, M., Maixner, F., Berry, D., Rattei, T., Koch, H., Lücker, S., . . . Lebedeva, E. (2014). NxrB encoding the beta subunit of nitrite oxidoreductase as functional and phylogenetic marker for nitrite-oxidizing N itrospira. *Environmental Microbiology*, 16(10), 3055-3071.
- Pester, M., Rattei, T., Flechl, S., Gröngröft, A., Richter, A., Overmann, J., . . . Wagner, M. (2012). amoA-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of amoA genes from soils of four different geographic regions. *Environmental Microbiology*, 14(2), 525-539.

- Petropoulos, P., & Gilbride, K. A. (2005). Nitrification in activated sludge batch reactors is linked to protozoan grazing of the bacterial population. *Canadian Journal of Microbiology*, *51*(9), 791-799.
- Pfister, G., & Arndt, H. (1998). Food selectivity and feeding behaviour in omnivorous filter-feeding ciliates: a case study for *Stylonychia*. *European Journal of Protistology*, *34*(4), 446-457.
- Pinto, A. J., Marcus, D. N., Ijaz, U. Z., Bautista-de Lose Santos, Q. M., Dick, G. J., & Raskin, L. (2016). Metagenomic evidence for the presence of comammox Nitrospira-like bacteria in a drinking water system. *mSphere*, *1*(1), e00054-00015.
- Pjevac, P., Schaubberger, C., Poghosyan, L., Herbold, C. W., van Kessel, M. A. H. J., Daebeler, A., . . . Daims, H. (2017). AmoA-Targeted Polymerase Chain Reaction Primers for the Specific Detection and Quantification of Comammox Nitrospira in the Environment [Methods]. *Frontiers in Microbiology*, *8*(1508). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01508>
- Press, W. H., Flannery, B. P., Teukolsky, S. A., & Vetterling, W. T. (1992). Numerical Recipes in C, Cambridge University Press. *New York*.
- Prosser, J. I., & Nicol, G. W. (2012). Archaeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil: the quest for niche specialisation and differentiation. *Trends in Microbiology*, *20*(11), 523-531. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.08.001>
- Puigagut, J., Salvadó, H., & García, J. (2005). Short-term harmful effects of ammonia nitrogen on activated sludge microfauna. *Water Research*, *39*(18), 4397-4404.
- Puigagut, J., Salvadó, H., Tarrats, X., & García, J. (2007). Effects of particulate and soluble substrates on microfauna populations and treatment efficiency in activated sludge systems. *Water Research*, *41*(14), 3168-3176.
- Purkhold, U., Pommerening-Röser, A., Juretschko, S., Schmid, M. C., Koops, H.-P., & Wagner, M. (2000). Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(12), 5368-5382.
- Ramesh, A., Lee, D. J., & Lai, J. Y. (2007). Membrane biofouling by extracellular polymeric substances or soluble microbial products from membrane bioreactor sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *74*(3), 699-707. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0706-x>
- Ramette, A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, *62*(2), 142-160.
- Ramírez, E. (2004). Fundamentos teóricos de lodos activados y aereación extendida. Recuperado de <http://documentacion.ideam.gov>.

co/openbiblio/bvirtual/018834/MEMORIAS2004/CapituloII/1Fundamentosdelproceso delodosactivados. pdf (Octubre, 2017).

- Ratsak, C., Maarsen, K., & Kooijman, S. (1996). Effects of protozoa on carbon mineralization in activated sludge. *Water Research*, 30(1), 1-12.
- Ratsak, C. H., & Verkuijden, J. (2006). Sludge reduction by predatory activity of aquatic oligochaetes in wastewater treatment plants: science or fiction? A review. *Hydrobiologia*, 564(1), 197-211.
- Ravn, L., Christensen, A. B., Molin, S., Givskov, M., & Gram, L. (2001). Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by Gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics.
- Reading, N. C., & Sperandio, V. (2006). Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 254(1), 1-11.
- Roberts, D. (2013). Package 'labdsv'. R package version 1. 6-1. In.
- Røder, H. L., Olsen, N. M. C., Whiteley, M., & Burmølle, M. (2020). Unravelling interspecies interactions across heterogeneities in complex biofilm communities. *Environmental Microbiology*, 22(1), 5-16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1462-2920.14834>
- Røder, H. L., Raghupathi, P. K., Herschend, J., Brejnrod, A., Knøchel, S., Sørensen, S. J., & Burmølle, M. (2015). Interspecies interactions result in enhanced biofilm formation by co-cultures of bacteria isolated from a food processing environment. *Food Microbiology*, 51, 18-24.
- Rodríguez, E., Isac, L., Álvarez, M., Zornoza, A., & Fernández, N. (2005). Tratamiento y Conservación de muestras para Análisis Microbiológicos de fangos activados. *Tecnología del Agua*, 265, 60-70.
- Rodríguez, E., Isac, L., Salas, M. D., Fernández, N., Zornoza, A., Pérez-Uz, B., . . . Estévez, F. (2008). *Manual práctico para el estudio de grupos bioindicadores en fangos activos* (R. B. I.-T. d. Agua, Ed.).
- Rodríguez, J. P., Suazo, Á., & Santelices, I. (2016). Análisis por medio de la normalización de variables para un modelo de planificación ambiental hídrica estacional. *Obras y proyectos*(20), 76-85.
- Rodríguez, P., & Arenas, R. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 2, 166-167.
- Roots, P., Wang, Y., Rosenthal, A. F., Griffin, J. S., Sabba, F., Petrovich, M., . . . Wells, G. F. (2019). Comammox Nitrospira are the dominant ammonia oxidizers in a mainstream low dissolved oxygen nitrification reactor. *Water Research*, 157, 396-405.

- Rothery, R. A., Workun, G. J., & Weiner, J. H. (2008). The prokaryotic complex iron–sulfur molybdoenzyme family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1778(9), 1897-1929.
- Rotthauwe, J.-H., Witzel, K.-P., & Liesack, W. (1997). The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), 4704-4712.
- Saikaly, P. E., & Oerther, D. B. (2011). Diversity of dominant bacterial taxa in activated sludge promotes functional resistance following toxic shock loading. *Microbial Ecology*, 61(3), 557-567.
- Saikaly, P. E., Stroot, P. G., & Oerther, D. B. (2005). Use of 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis to assess the impact of solids retention time on the bacterial diversity of activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 5814-5822.
- Sakoula, D., Koch, H., Frank, J., Jetten, M. S. M., van Kessel, M. A. H. J., & Lücker, S. (2020). Enrichment and physiological characterization of a novel comammox Nitrospira indicates ammonium inhibition of complete nitrification. *Isme j*, 15(4), 1010-1024. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00827-4>
- Salvadó, H. (1994). Effect of mean cellular retention time on ciliated protozoan populations in urban wastewater treatment plants based on a proposed model. *Water Research*, 28(6), 1315-1321.
- Salvadó, H., & Gracia, M. (1993). Determination of organic loading rate of activated sludge plants based on protozoan analysis. *Water Research*, 27(5), 891-895.
- Salvadó, H., Gracia, M., & Amigó, J. (1995). Capability of ciliated protozoa as indicators of effluent quality in activated sludge plants. *Water Research*, 29(4), 1041-1050.
- Salvadó, H., Palomo, A., Mas, M., Puigagut, J., & del Pilar Gracia, M. (2004). Dynamics of nematodes in a high organic loading rotating biological contactors. *Water Research*, 38(10), 2571-2578.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463-5467.
- Sarwar, Z., & Garza, A. G. (2012). The Nla28S/Nla28 two-component signal transduction system regulates sporulation in Myxococcus xanthus. *Journal of Bacteriology*, 194(17), 4698-4708. <https://doi.org/10.1128/jb.00225-12>
- Sauder, L. A., Peterse, F., Schouten, S., & Neufeld, J. D. (2012). Low-ammonia niche of ammonia-oxidizing archaea in rotating biological contactors of a municipal wastewater treatment plant. *Environmental Microbiology*, 14(9), 2589-2600.

- Saunders, A. M., Oehmen, A., Blackall, L. L., Yuan, Z., & Keller, J. (2003). The effect of GAOs (glycogen accumulating organisms) on anaerobic carbon requirements in full-scale Australian EBPR (enhanced biological phosphorus removal) plants. *Water Science and Technology*, 47(11), 37-43.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Sedano, P., Ontañón, N., & López, R. (2014). EDAR Arroyo Valenoso. *Retema*, 178, 9-20.
- Sedlak, R. (1991). *Phosphorus and nitrogen removal from municipal wastewater: principles and practice* (20 ed.). Lewis Publisher.
- Serrano, S., Arregui, L., Perez-Uz, B., Calvo, P., & Guinea, A. (2008). *Guidelines for the identification of ciliates in wastewater treatment plants*. IWA Publishing.
- Seviour, R., & Nielsen, P. H. (2010). *Microbial ecology of activated sludge*. IWA publishing.
- Shanks, O. C., Newton, R. J., Kelty, C. A., Huse, S. M., Sogin, M. L., & McLellan, S. L. (2013). Comparison of the microbial community structures of untreated wastewaters from different geographic locales. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(9), 2906-2913. <https://doi.org/10.1128/AEM.03448-12>
- Shannon, C. E., & Weaver, W. (1949). A mathematical model of communication. *Urbana, IL: University of Illinois Press*, 11.
- Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591-611.
- Shen, Y.-C., Hu, Y.-N., & Shaw, G.-C. (2016). Expressions of alkaline phosphatase genes during phosphate starvation are under positive influences of multiple cell wall hydrolase genes in *Bacillus subtilis*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 62(2), 106-109.
- Shepard, R. N. (1962a). The analysis of proximities: multidimensional scaling with an unknown distance function. I. *Psychometrika*, 27(2), 125-140.
- Shepard, R. N. (1962b). The analysis of proximities: Multidimensional scaling with an unknown distance function. II. *Psychometrika*, 27(3), 219-246.
- Sherr, E. B., & Sherr, B. F. (2002). Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1), 293-308.
- Shi, Y., Jiang, Y., Wang, S., Wang, X., & Zhu, G. (2020). Biogeographic distribution of comammox bacteria in diverse terrestrial habitats. *Science of the Total Environment*, 717, 137257.

- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., . . . Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7(1), 539. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Signorile, G., Molinari, A., Lugoli, F., Sciancalepore, L., Montemurro, P., & De Donno, M. A. (2010). Study of the correlation between microfauna and the macrostructure of activated sludge and the efficiency of biological wastewater treatment plants. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 51(1).
- Šimek, K., Bobková, J., Macek, M., Nedoma, J., & Psenner, R. (1995). Ciliate grazing on picoplankton in a eutrophic reservoir during the summer phytoplankton maximum: A study at the species and community level. *Limnology and Oceanography*, 40(6), 1077-1090.
- Simpson, E. H. (1949). Measurement of diversity. *Nature*, 163(4148), 688-688.
- Siqueira-Castro, I. C. V., Greinert-Goulart, J. A. j., Rossetto, R., Guimarães, J. R., & Franco, R. M. B. (2016). Ciliated protozoa community of a combined UASB-activated sludge system in southeastern Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(23), 23804-23814. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7591-3>
- Siripong, S., & Rittmann, B. E. (2007). Diversity study of nitrifying bacteria in full-scale municipal wastewater treatment plants. *Water Research*, 41(5), 1110-1120.
- Snaird, J., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W., & Schleifer, K.-H. (1997). Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7), 2884-2896.
- Sogin, M. L., Morrison, H. G., Huber, J. A., Welch, D. M., Huse, S. M., Neal, P. R., . . . Herndl, G. J. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(32), 12115-12120.
- Soler, A., Arregui, L., Arroyo, M., Mendoza, J. A., Muras, A., Álvarez, C., . . . Serrano, S. (2018). Quorum sensing versus quenching bacterial isolates obtained from MBR plants treating leachates from municipal solid waste. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(5), 1019.
- Sorokin, D. Y., Lücker, S., Vejmolkova, D., Kostrikina, N. A., Kleerebezem, R., Rijpstra, W. I. C., . . . Wagner, M. (2012). Nitrification expanded: discovery, physiology and genomics of a nitrite-oxidizing bacterium from the phylum Chloroflexi. *Isme j*, 6(12), 2245-2256.
- Spahn, S. A., & Sherry, T. W. (1999). Cadmium and Lead Exposure Associated with Reduced Growth Rates, Poorer Fledging Success of Little Blue Heron Chicks (*Egretta caerulea*) in South Louisiana Wetlands. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37(3), 377-384. <https://doi.org/10.1007/s002449900528>

- Spasov, E., Tsuji, J. M., Hug, L. A., Doxey, A. C., Sauder, L. A., Parker, W. J., & Neufeld, J. D. (2020). High functional diversity among *Nitrospira* populations that dominate rotating biological contactor microbial communities in a municipal wastewater treatment plant. *Isme j*, *14*(7), 1857-1872.
- Spieck, E., & Bock, E. (2005). The lithoautotrophic nitriteoxidizing bacteria. In D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley, G. M. Garrity, D. R. Boone, P. D. Vos, M. Goodfellow, F. A. Rainey, & K.-H. Schleifer (Eds.), *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* (pp. 149-153). Springer Science+Business Media.
- Spieck, E., Ehrich, S., Aamand, J., & Bock, E. (1998). Isolation and immunocytochemical location of the nitrite-oxidizing system in *Nitrospira moscoviensis*. *Archives of Microbiology*, *169*(3), 225-230.
- Stamper, D. M., Walch, M., & Jacobs, R. N. (2003). Bacterial population changes in a membrane bioreactor for graywater treatment monitored by denaturing gradient gel electrophoretic analysis of 16S rRNA gene fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(2), 852-860.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, *40*(2), 175-179.
- Student. (1908). The probable error of a mean. *Biometrika*, 1-25.
- Sun, D., Tang, X., Zhao, M., Zhang, Z., Hou, L., Liu, M., . . . Han, P. (2020). Distribution and diversity of comammox *Nitrospira* in coastal wetlands of China. *Frontiers in Microbiology*, 2480.
- Taguchi, Y.-H., & Oono, Y. (2005). Relational patterns of gene expression via non-metric multidimensional scaling analysis. *Bioinformatics*, *21*(6), 730-740.
- Takahashi, Y., Fujitani, H., Hirono, Y., Tago, K., Wang, Y., Hayatsu, M., & Tsuneda, S. (2020). Enrichment of comammox and nitrite-oxidizing *Nitrospira* from acidic soils. *Frontiers in Microbiology*, 1737.
- Takimoto, Y., Hatamoto, M., Ishida, T., Watari, T., & Yamaguchi, T. (2018). Fouling Development in A/O-MBR under Low Organic Loading Condition and Identification of Key Bacteria for Biofilm Formations. *Scientific Reports*, *8*(1), 11427-11427. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29821-9>
- Talagrand-Reboul, E., Jumas-Bilak, E., & Lamy, B. (2017). The Social Life of *Aeromonas* through Biofilm and Quorum Sensing Systems. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 37-37. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00037>

- Tan, C. H., Lee, K. W. K., Burmølle, M., Kjelleberg, S., & Rice, S. A. (2017). All together now: experimental multispecies biofilm model systems. *Environmental Microbiology*, 19(1), 42-53. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13594>
- Tan, C. H., Yeo, Y. P., Hafiz, M., Ng, N. K. J., Subramoni, S., Taj, S., . . . Rice, S. A. (2021). Functional metagenomic analysis of quorum sensing signaling in a nitrifying community. *NPJ biofilms and microbiomes*, 7(1), 79-79. <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00250-3>
- ter Braak, C. J., & Smilauer, P. (2002). *CANOCO reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: software for canonical community ordination (version 4.5)*.
- ter Braak, C. J. F. (1987). *Data Analysis in Community and Landscape Ecology*. Pudoc.
- Tocchi, C., Federici, E., Fidati, L., Manzi, R., Vincigurerra, V., & Petruccioli, M. (2012). Aerobic treatment of dairy wastewater in an industrial three-reactor plant: Effect of aeration regime on performances and on protozoan and bacterial communities. *Water Research*, 46(10), 3334-3344.
- Tomb, J.-F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., . . . Dougherty, B. A. (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 388(6642), 539-547.
- Tyagi, V. K., Subramaniyan, S., Kazmi, A. A., & Chopra, A. (2008). Microbial community in conventional and extended aeration activated sludge plants in India. *Ecological Indicators*, 8(5), 550-554.
- Uhlmann, D. (1982). *Hydrobiologie: ein Grundriß für Ingenieure und Naturwissenschaftler* (2 ed.). Fischer.
- UNEP. (1992). *Convention on Biological Diversity*. Environmental Law and Institutions Program Activity Centre
- Urbain, V., Block, J., & Manem, J. (1992). Bioflocculation in activated sludge, an analytic approach. *Water Science and Technology*, 25(4-5), 441-443.
- Urbanczyk, H., Ast, J. C., Higgins, M. J., Carson, J., & Dunlap, P. V. (2007). Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(Pt 12), 2823-2829. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65081-0>
- van Kessel, M. A. H. J., Speth, D. R., Albertsen, M., Nielsen, P. H., Op den Camp, H. J. M., Kartal, B., . . . Lückner, S. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, 528(7583), 555-559. <https://doi.org/10.1038/nature16459>

- Viessman, W., Hammer, M. J., Perez, E. M., & Chadik, P. A. (1998). Water supply and pollution control.
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1999). Digital PCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(16), 9236-9241. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.9236>
- Wagner, M., & Loy, A. (2002). Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 218-227.
- Wallner, G., Erhart, R., & Amann, R. (1995). Flow cytometric analysis of activated sludge with rRNA-targeted probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(5), 1859-1866.
- Wan, C.-Y., De Wever, H., Diels, L., Thoeye, C., Liang, J.-B., & Huang, L.-N. (2011). Biodiversity and population dynamics of microorganisms in a full-scale membrane bioreactor for municipal wastewater treatment. *Water Research*, 45(3), 1129-1138.
- Wang, Y., Ma, L., Mao, Y., Jiang, X., Xia, Y., Yu, K., . . . Zhang, T. (2017). Comammox in drinking water systems. *Water Research*, 116, 332-341. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.042>
- Wang, Y., Zhao, R., Liu, L., Li, B., & Zhang, T. (2021). Selective enrichment of comammox from activated sludge using antibiotics. *Water Research*, 197, 117087.
- Weisse, T. (2004). 13 Pelagic Microbes—Protozoa and the Microbial Food Web. *The lakes handbook: limnology and limnetic ecology*, 1, 417.
- Weisse, T. (2014). Ciliates and the rare biosphere—community ecology and population dynamics. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 61(4), 419-433.
- Weisse, T., Nicole, K., Volker, C. L. M., Lore, J., Sabine, L., & Kathrin, T. Â. b. (2001). Niche separation in common prostome freshwater ciliates: the effect of food and temperature. *Aquatic Microbial Ecology*, 26(2), 167-179.
- Wells, G. F., Park, H.-D., Yeung, C.-H., Eggleston, B., Francis, C. A., & Criddle, C. S. (2009). Ammonia-oxidizing communities in a highly aerated full-scale activated sludge bioreactor: betaproteobacterial dynamics and low relative abundance of Crenarchaea. *Environmental Microbiology*, 11(9), 2310-2328. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01958.x>
- Whittaker, R. H. (1960). Vegetation of the Siskiyou mountains, Oregon and California. *Ecological Monographs*, 30(3), 279-338.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. springer.

- Wilderer, P. A., Bungartz, H.-J., Lemmer, H., Wagner, M., Keller, J., & Wuertz, S. (2002). Modern scientific methods and their potential in wastewater science and technology. *Water Research*, *36*(2), 370-393.
- Wilén, B.-M., Jin, B., & Lant, P. (2003). Relationship between flocculation of activated sludge and composition of extracellular polymeric substances. *Water Science and Technology*, *47*(12), 95-103.
- Winkler, M. K. H., Kleerebezem, R., de Bruin, L. M. M., Verheijen, P. J. T., Abbas, B., Habermacher, J., & van Loosdrecht, M. C. M. (2013). Microbial diversity differences within aerobic granular sludge and activated sludge flocs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(16), 7447-7458. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4472-7>
- Woodcock, S., Curtis, T. P., Head, I. M., Lunn, M., & Sloan, W. T. (2006). Taxa–area relationships for microbes: the unsampled and the unseen. *Ecology Letters*, *9*(7), 805-812. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00929.x>
- Wu, L., Ning, D., Zhang, B., Li, Y., Zhang, P., Shan, X., . . . Zhou, J. (2019). Global diversity and biogeography of bacterial communities in wastewater treatment plants. *Nat Microbiol*, *4*(7), 1183-1195. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0426-5>
- Xia, F., Wang, J.-G., Zhu, T., Zou, B., Rhee, S.-K., & Quan, Z.-X. (2018). Ubiquity and Diversity of Complete Ammonia Oxidizers (Comammox). *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(24), e01390-01318. <https://doi.org/10.1128/AEM.01390-18>
- Xia, Y., Wen, X., Zhang, B., & Yang, Y. (2018). Diversity and assembly patterns of activated sludge microbial communities: A review. *Biotechnology Advances*, *36*(4), 1038-1047. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.005>
- Xu, S., Wu, X., & Lu, H. (2021). Overlooked nitrogen-cycling microorganisms in biological wastewater treatment. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, *15*(6), 1-13.
- Yang, Y., Daims, H., Liu, Y., Herbold, C. W., Pjevac, P., Lin, J.-G., . . . Gu, J.-D. (2020). Activity and metabolic versatility of complete ammonia oxidizers in full-scale wastewater treatment systems. *Mbio*, *11*(2), e03175-03119.
- Yang, Y., Wang, L., Xiang, F., Zhao, L., & Qiao, Z. (2020). Activated Sludge Microbial Community and Treatment Performance of Wastewater Treatment Plants in Industrial and Municipal Zones. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(2), 436. <https://doi.org/10.3390/ijerph17020436>
- Yin, W.-F., Purmal, K., Chin, S., Chan, X.-Y., Koh, C.-L., Sam, C.-K., & Chan, K.-G. (2012). N-acyl homoserine lactone production by *Klebsiella pneumoniae* isolated from human tongue surface. *Sensors*, *12*(3), 3472-3483.
- Yin, Z., Bi, X., & Xu, C. (2018). Ammonia-oxidizing archaea (AOA) play with ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in nitrogen removal from wastewater. *Archaea*, 2018.

- Yoon, S.-H., Ha, S.-M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), 1613-1617. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>
- Zahedi, A., Greay, T. L., Paparini, A., Linge, K. L., Joll, C. A., & Ryan, U. M. (2019). Identification of eukaryotic microorganisms with 18S rRNA next-generation sequencing in wastewater treatment plants, with a more targeted NGS approach required for Cryptosporidium detection. *Water Research*, 158, 301-312. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.04.041>
- Zhang, Q., Jie, Y. W., Loong, W. L. C., Zhang, J., Fane, A. G., Kjelleberg, S., . . . McDougald, D. (2014). Characterization of biofouling in a lab-scale forward osmosis membrane bioreactor (FOMBR). *Water Research*, 58, 141-151. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.03.052>
- Zhao, Y., Hu, J., Yang, W., Wang, J., Jia, Z., Zheng, P., & Hu, B. (2021). The long-term effects of using nitrite and urea on the enrichment of comammox bacteria. *Science of the Total Environment*, 755, 142580.
- Zheng, W., & Wen, X. (2019). How exogenous influent communities and environmental conditions affect activated sludge communities in the membrane bioreactor of a wastewater treatment plant. *Science of the Total Environment*, 692, 622-630.
- Zhou, H., & Smith, D. W. (2001). Advanced technologies in water and wastewater treatment. *Canadian Journal of Civil Engineering*, 28(S1), 49-66. <https://doi.org/10.1139/100-091>
- Zhou, K., Xu, M., Dai, J., & Cao, H. (2006). The microfauna communities and operational monitoring of an activated sludge plant in China. *European Journal of Protistology*, 42(4), 291-295.
- Zhou, L. J., Han, P., Yu, Y., Wang, B., Men, Y., Wagner, M., & Wu, Q. L. (2019). Cometabolic biotransformation and microbial-mediated abiotic transformation of sulfonamides by three ammonia oxidizers. *Water Research*, 159, 444-453. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.05.031>
- Zhou, L. J., Han, P., Zhao, M., Yu, Y., Sun, D., Hou, L., . . . Wu, Q. L. (2021). Biotransformation of lincomycin and fluoroquinolone antibiotics by the ammonia oxidizers AOA, AOB and comammox: A comparison of removal, pathways, and mechanisms. *Water Research*, 196, 117003. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117003>
- Zhou, X., Li, B., Wei, J., Ye, Y., Xu, J., Chen, L., & Lu, C. (2021). Temperature Influenced the Comammox Community Composition in Drinking Water and Wastewater Treatment Plants. *Microbial Ecology*, 82(4), 870-884.

- Zhu, G., Wang, X., Wang, S., Yu, L., Armanbek, G., Yu, J., . . . Zhu, Y.-G. (2022). Towards a more labor-saving way in microbial ammonium oxidation: A review on complete ammonia oxidation (comammox). *Science of the Total Environment*, 829, 154590. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154590>
- Zhu, Z., Shan, L., Hu, F., Li, Z., Zhong, D., Yuan, Y., & Zhang, J. (2020). Biofilm formation potential and chlorine resistance of typical bacteria isolated from drinking water distribution systems. *RSC Adv*, 10(52), 31295-31304. <https://doi.org/10.1039/d0ra04985a>
- Zhu, Z., Shan, L., Zhang, X., Hu, F., Zhong, D., Yuan, Y., & Zhang, J. (2021). Effects of bacterial community composition and structure in drinking water distribution systems on biofilm formation and chlorine resistance. *Chemosphere*, 264, 128410. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128410>
- Zornoza, A. (2012). *Análisis de las correlaciones entre los parámetros operacionales, físico-químicos y biológicos asociados al proceso de fangos activos [Tesis Doctorado Ingeniería del Agua y Medioambiental]* Universidad Politécnica de Valencia]. Valencia.
- Zornoza, A. (2017). *Estudio de la dinámica poblacional de protistas, metazoos y bacterias filamentosas y su interpretación ecológica en fangos activos* Universitat Politècnica de València].

ANEXO

8. ANEXO

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 8.1: Calidad del influente esperada durante el diseño de la planta.....	305
Tabla 8.2: Calidad del efluente esperada durante el diseño de la planta.....	305
Tabla 8.3: Legislación aplicable acorde al ámbito territorial de la EDAR de Arroyo Valenoso.....	305
Tabla 8.4: Requisitos para los vertidos procedentes de instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas establecidos en el RD 509/1996.	306
Tabla 8.5: Requisitos de los vertidos procedentes de instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas realizados en zonas sensibles cuyas aguas sean eutróficas o tengan tendencia a serlo en un futuro próximo establecidos en el RD 509/1996.....	307
Tabla 8.6: Información detallada de los muestreos. Fecha, estación de muestreo y observaciones relevantes.....	307
Tabla 8.7: Parámetros y unidades de medida de las variables fisicoquímicas y operacionales analizadas.	307
Tabla 8.8: Valores obtenidos de las variables fisicoquímicas del influente. Los asteriscos indican muestreos para los cuales no se obtuvieron datos debido a problemas técnicos con los equipos de medida.....	308
Tabla 8.9: Valores obtenidos de las variables fisicoquímicas del efluente. Los asteriscos indican muestreos para los cuales no se obtuvieron datos debido a problemas técnicos con los equipos de medida.....	309
Tabla 8.10: Rendimientos de depuración de los parámetros contemplados en el RD 509/1996. Los asteriscos indican ausencia de datos.	309

Tabla 8.11: Valores obtenidos para las variables operacionales medidas en la cámara aeróbica. TRC y TRH se obtienen mediante cálculo.	310
Tabla 8.12: Valores de los parámetros operacionales proporcionados por el laboratorio de la EDAR Arroyo Valenoso.....	311
Tabla 8.13: Concentraciones de variables relativas a nitrógeno y fósforo obtenidas en la cámara anóxica. Los asteriscos indican muestreos para los cuales no se obtuvieron datos debido a problemas técnicos con los equipos de medida.	312
Tabla 8.14: Concentraciones de variables relativas a nitrógeno y fósforo obtenidas en la cámara aeróbica. Los asteriscos indican muestreos para los cuales no se obtuvieron datos debido a problemas técnicos con los equipos de medida.	312
Tabla 8.15: Concentraciones de variables relativas a nitrógeno y fósforo obtenidas en el reactor MBR. Los asteriscos indican muestreos para los cuales no se obtuvieron datos debido a problemas técnicos con los equipos de medida.	313
Tabla 8.16: Decantabilidad, características macroscópicas y microscópicas del fango activo para cada muestreo. Índice de Fango para cada reactor para cada muestreo. A: cámara anóxica; B: cámara aeróbica; C: Reactor MBR.	313
Tabla 8.17: Media y desviación estándar (DE) del valor medio de gris y de la proporción de bacterias no viables (NV) y bacterias viables (V), en el biorreactor; A: cámara anóxica; B: cámara aeróbica y C: reactor MBR.	314
Tabla 8.18: Recuento de bacterias viables totales, enterobacterias y pseudomonádaceas en la cámara anóxica. “NAPR”, No Apto Para Recuento.	315
Tabla 8.19: Recuento de bacterias viables totales, enterobacterias y pseudomonádaceas en la cámara aeróbica. “NAPR”, No Apto Para Recuento.	316
Tabla 8.20: Recuento de bacterias viables totales, enterobacterias y pseudomonádaceas en el reactor MBR. “NAPR”, No Apto Para Recuento.	317

Tabla 8.21: Número de individuos, taxones y su proporción. Resultados provenientes de aquellas especies cuya frecuencia de aparición era igual o superior al 15%. A: Reactor anóxico; B: Reactor aeróbico; C: Reactor MBR.....	318
Tabla 8.22: Clasificación de protistas y micrometazoos	319
Tabla 8.23: Correspondencia entre el código de taxón (CT) y su identificación (nombre genérico o específico).....	320
Tabla 8.24: Abundancia absoluta (ind/mL) de protistas y micrometazoos en la cámara anóxica para cada muestreo.....	321
Tabla 8.25: Media, desviación estándar (DE) y rango de la abundancia absoluta (ind/mL) de protistas y micrometazoos en la cámara anóxica.	322
Tabla 8.26: Abundancia absoluta (ind/mL) de protistas y micrometazoos en la cámara aeróbica para cada muestreo.	323
Tabla 8.27: Media, desviación estándar (DE) y rango de la abundancia absoluta (ind/mL) de protistas y micrometazoos en la cámara aeróbica.	324
Tabla 8.28: Abundancia absoluta (ind/mL) de protistas y micrometazoos en el reactor MBR para cada muestreo.	326
Tabla 8.29: Media, desviación estándar (DE) y rango de la abundancia absoluta (ind/mL) de protistas y micrometazoos en el reactor MBR.	327
Tabla 8.30: Índices de diversidad alfa para los tres reactores biológicos. A: Reactor anóxico; B: Reactor aeróbico; C: Reactor MBR.....	329
Tabla 8.31: Número de apariciones (NA), frecuencia de aparición (FA) y abundancia relativa (AR) de los diferentes taxones identificados en la cámara anóxica.	330
Tabla 8.32: Número de apariciones (NA), frecuencia de aparición (FA) y abundancia relativa (AR) de los diferentes taxones identificados en la cámara aeróbica.	331

Tabla 8.33: Número de apariciones (NA), frecuencia de aparición (FA) y abundancia relativa (AR) de los diferentes taxones identificados en el reactor MBR. 332

Tabla 8.34: Media y desviación estándar (DE) por muestra y global de la proporción de bacterias amonio oxidantes (AOB) y bacterias nitrito oxidantes (NOB) respecto de las bacterias viables totales (VT), en los reactores: A: Reactor anóxico; B: Reactor aeróbico. 333

Tabla 8.35: Concentración, intervalo de confianza (IC), media y desviación estándar (DE) obtenido para las diferentes dianas analizadas mediante PCR digital. 334

Tabla 8.36: Identificación de las cepas procedentes del licor mezcla de la EDAR Arroyo Valenoso y su código correspondiente en la base de datos del NCBI. El asterisco (*) indica que es una cepa sin identificar. 334

Tabla 8.36: Valores de absorbancia obtenida a partir del ensayo del cristal violeta realizado a las cepas bacterianas aisladas de la membrana del reactor MBR. 336

TABLAS

Tabla 8.1: Calidad del influente esperada durante el diseño de la planta.

Parámetro	Valor medio (mg/L)	Valor punta (mg/L)
DBO ₅	200	300
DQO	400	600
SST	250	375
NTK	37	55
PT	6	9

Tabla 8.2: Calidad del efluente esperada durante el diseño de la planta.

Parámetro	Concentración
DBO ₅	≤ 10 mg/L
SST	≤ 10 mg/L
NTK	≤ 15 mg/L
PT	≤ 2 mg/L
pH	6 ≤ pH ≤ 9

Tabla 8.3: Legislación aplicable acorde al ámbito territorial de la EDAR de Arroyo Valenoso.

Ámbito territorial general

Real Decreto 198/2015, de 23 de marzo, por el que se desarrolla el artículo 112 bis del texto refundido de la Ley de Aguas y se regula el canon por utilización de las aguas continentales para la producción de energía eléctrica en las demarcaciones intercomunitarias: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2015-3182>

Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2001-14276>

Dominio Público Hidráulico

Real Decreto 927/1988, de 29 de julio, por el que se aprueba el Reglamento de la Administración Pública del Agua y de la Planificación Hidrológica, en desarrollo de los títulos II y III de la Ley de Aguas: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-1988-20883>

Real Decreto 849/1986, de 11 de abril, por el que se aprueba el Reglamento del Dominio Público Hidráulico, que desarrolla los títulos preliminar I, IV, V, VI y VII de la Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-1986-10638>

Demarcación Hidrográfica

Real Decreto 1704/2011, de 18 de noviembre, por el que se establece la composición, estructura y funcionamiento del Consejo del Agua de la demarcación de la parte española de la Demarcación Hidrográfica del Tajo: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2011-19298>

Real Decreto 126/2007, de 2 de febrero, por el que se regulan la composición, funcionamiento y atribuciones de los comités de autoridades competentes de las demarcaciones hidrográficas con cuencas intercomunitarias: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2007-2297>

Real Decreto 125/2007, de 2 de febrero, por el que se fija el ámbito territorial de las demarcaciones hidrográficas: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2007-2296>

Planificación Hidrográfica

Real Decreto 1/2016, de 8 de enero, por el que se aprueba la revisión de los Planes Hidrológicos de las demarcaciones hidrográficas del Cantábrico Occidental, Guadalquivir, Ceuta, Melilla, Segura y Júcar, y de la parte española de las demarcaciones hidrográficas del Cantábrico Oriental, Miño-Sil, Duero, Tajo, Guadiana y Ebro: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2016-439>

Ley 10/2001, de 5 de julio, del Plan Hidrológico Nacional: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2001-13042>

Real Decreto 907/2007, de 6 de julio, por el que se aprueba el Reglamento de la Planificación Hidrológica: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2007-13182>

Real Decreto 650/1987, de 8 de mayo, por el que se definen los ámbitos territoriales de los Organismos de cuenca y de los planes hidrológicos: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-1987-12212>

Calidad de las Aguas

Real Decreto 817/2015, de 11 de septiembre, por el que se establecen los criterios de seguimiento y evaluación del estado de las aguas superficiales y las normas de calidad ambiental: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2015-9806>

Real Decreto 1514/2009, de 2 de octubre, por el que se regula la protección de las aguas subterráneas contra la contaminación y el deterioro: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2009-16772>

Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2007-21092>

Real Decreto 509/1996, de 15 de marzo, de desarrollo del Real Decreto-ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-1996-7159>

Real Decreto 261/1996, de 16 de febrero, sobre protección de las aguas contra la contaminación producida por los nitratos procedentes de fuentes agrarias: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-1996-5618>

Real Decreto-ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-1995-27963>

Otras normas relacionadas

Ley 2/2013, de 29 de mayo, de protección y uso sostenible del litoral y de modificación de la Ley 22/1988, de 28 de julio, de Costas. [Inclusión parcial]: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2013-5670>

Real Decreto-ley 17/2012, de 4 de mayo, de medidas urgentes en materia de medio ambiente: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2012-5989>

Real Decreto 903/2010, de 9 de julio, de evaluación y gestión de riesgos de inundación: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2010-11184>

Real Decreto 2090/2008, de 22 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo parcial de la Ley 26/2007, de 23 de octubre, de Responsabilidad Medioambiental: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2008-20680>

Real Decreto 822/2008, de 16 de mayo, por el que se crea la Oficina del Fondo de Cooperación para Agua y Saneamiento: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2008-10709>

Ley 42/2007, de 13 de diciembre, del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2007-21490>

Ley 27/2006, de 18 de julio, por la que se regulan los derechos de acceso a la información, de participación pública y de acceso a la justicia en materia de medio ambiente (incorpora las Directivas 2003/4/CE y 2003/35/CE): <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2006-13010>

Ley 22/1988, de 28 de julio, de Costas: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-1988-18762>

Real Decreto 2618/1986, de 24 de diciembre, por el que se aprueban medidas referentes a acuíferos subterráneos al amparo del artículo 56 de la Ley de Aguas: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-1986-33757>

Tabla 8.4: Requisitos para los vertidos procedentes de instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas establecidos en el RD 509/1996.

Parámetros	Concentración	Porcentaje mínimo de reducción (1)	Método de medida de referencia
Demanda bioquímica de oxígeno (DBO 5 a 20 °C) sin nitrificación (2).	25 mg/l O ₂	70-90 40 de conformidad con el apartado 3 del artículo 5 R.D.L. (3).	Muestra homogeneizada, sin filtrar ni decantar. Determinación a después de cinco días de incubación a 20 °C ± 1 °C, en completa oscuridad. Aplicación de un inhibidor de la nitrificación.
Demanda química de oxígeno (DQO).	125 mg/l O ₂	75	Muestra homogeneizada, sin filtrar ni decantar. Dicromato potásico
Total de sólidos en suspensión.	35 mg/l (4) 35 de conformidad con el apartado 3 del art. 5 R.D.L. (más de 10.000 h-e) (3). 60 de conformidad con el apartado 3 del art. 5 R.D.L. (de 2.000 a 10.000 h-e) (3).	90 (4) 90 de conformidad con el apartado 3 del art. 5 R.D.L. (más de 10.000 h-e) (3). 70 de conformidad con el apartado 3 del art. 5 R.D.L. (de 2.000 a 10.000 h-e) (3).	Filtración de una muestra representativa a través de una membrana de filtración de 0,45 micras. Secado a 105 °C y pesaje. Centrifugación de una muestra representativa (durante cinco minutos como mínimo, con una aceleración media de 2.800 a 3.200 g), seque a 105 °C y pesaje.

(1) Reducción relacionada con la carga del caudal de entrada.

(2) Este parámetro puede sustituirse por otro: carbono orgánico total (COT) o demanda total de oxígeno (DTO), si puede establecerse una correlación entre DBO₅ y el parámetro sustituto.

(3) Se refiere a los supuestos en regiones consideradas de alta montaña contemplada en el apartado 3 del artículo 5 del Real Decreto-ley 11/1995, de 28 de diciembre.

Tabla 8.5: Requisitos de los vertidos procedentes de instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas realizados en zonas sensibles cuyas aguas sean eutróficas o tengan tendencia a serlo en un futuro próximo establecidos en el RD 509/1996.

Parámetros	Concentración	Porcentaje mínimo de reducción (1)	Método de medida
Fósforo total.	2 mg/l P (de 10000 a 100000 h-e). 1 mg/l P (más de 100.000 h-e).	80	Espectrofotometría de ab
Nitrógeno total (2).	15 mg/l N (de 10000 a 100000 h-e). 10 mg/l N (más de 100000 h-e) (3).	70-80	Espectrofotometría de ab

(1) Reducción relacionada con la carga del caudal de entrada.
(2) Nitrógeno total equivalente a la suma de nitrógeno Kjeldahl total (N orgánico y amoniacal), nitrógeno en forma de nitrato y nitrógeno en forma de nitrito.

Tabla 8.6: Información detallada de los muestreos. Fecha, estación de muestreo y observaciones relevantes.

Muestreo	Fecha	Estación	Observaciones
1	27/03/2017	Primavera	
2	24/04/2017	Primavera	
3	23/05/2017	Primavera	
4	19/06/2017	Primavera	
5	20/07/2017	Verano	
6	21/08/2017	Verano	
7	25/09/2017	Otoño	
8	16/10/2017	Otoño	
9	07/11/2017	Otoño	
10	11/12/2017	Otoño	
11	15/01/2018	Invierno	
12	19/02/2018	Invierno	
13	12/03/2018	Invierno	Fuertes lluvias
14	09/04/2018	Primavera	
15	21/05/2018	Primavera	
16	11/06/2021	Primavera	Lluvias
17	30/07/2018	Verano	Bajo caudal en MBR
18	13/08/2018	Verano	

Tabla 8.7: Parámetros y unidades de medida de las variables fisicoquímicas y operacionales analizadas.

Nutrientes reactores		Variables operacionales		Fisicoquímicas influente/efluente	
Parámetro	Unidades	Parámetro	Unidades	Parámetro	Unidades
N-NH ₄ ⁺	mgN/L	SSLM	(mg/L)	pH	Ud
N-NO ₂ ⁻	mgN/L	SSVLM	(mg/L)	Turbidez	UNF
N-NO ₃ ⁻	mgN/L	V30	mL	Conductividad	μS/cm
TON	mgN/L	pH	Ud	SST	mg/L
NKjeldahl	mgN/L	T ^a	°C	DQO	mgO ₂ /L
NT	mgN/L	TRH	horas	DBO ₅	mgO ₂ /L
PT	mgP/L	TRC	días	N-NH ₄ ⁺	mgN/L
				N-NO ₂ ⁻	mgN/L
				N-NO ₃ ⁻	mgN/L
				NT	mgN/L
				PT	mgP/L

Tabla 8.8: Valores obtenidos de las variables fisicoquímicas del influente. Los asteriscos indican muestreos para los cuales no se obtuvieron datos debido a problemas técnicos con los equipos de medida.

Parámetro	pH	Turbidez	Conductividad	SST	DQO	DBO ₅	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₂ ⁻	N-NO ₃ ⁻	TON	NKjeldahl	NT	PT
Muestras \ Unidades	Ud.	UNF	μS/cm	mg/L	mgO ₂ /L	mgO ₂ /L	mgN/L	mgN/L	mgN/L	mgN/L	mgN/L	mgN/L	mgP/L
A01-1	7,465	46,800	526,000	91,600	187,700	46,900	14,335	0,126	1,275	1,400	20,065	21,465	2,211
A01-2	8,066	74,600	993,600	159,200	399,600	190,000	36,248	0,021	0,446	0,466	58,943	59,409	5,700
A01-3	7,817	74,500	1066,000	126,800	282,700	141,000	35,371	0,001	0,000	0,001	45,227	45,227	5,671
A01-4	7,811	83,100	1042,500	166,400	360,600	186,000	34,950	0,025	0,000	0,025	*	*	*
A01-5	7,748	*	993,400	614,800	721,800	239,000	*	*	*	0,000	51,192	51,192	10,917
A01-6	7,979	54,200	977,700	91,200	237,800	107,000	34,629	0,009	0,882	0,891	42,766	43,657	4,843
A01-7	8,167	109,000	1124,000	221,200	382,550	236,000	77,969	0,000	0,000	0,000	59,352	59,352	7,666
A01-8	7,628	85,000	938,600	168,000	278,600	138,000	51,275	0,013	0,000	0,013	49,611	49,623	5,453
A01-9	7,999	68,500	849,500	135,200	427,630	166,000	53,928	0,007	0,000	0,007	43,017	43,024	4,665
A01-10	7,708	527,000	485,800	616,000	737,340	191,000	24,235	0,063	1,619	1,682	24,882	26,564	12,985
A01-11	7,803	83,600	706,500	152,000	324,800	169,000	32,786	0,012	0,000	0,012	36,389	36,401	3,730
A01-12	7,956	86,600	1173,000	170,400	360,550	172,000	48,836	0,044	0,000	0,044	51,276	51,320	4,770
A01-13	8,128	93,700	848,800	170,294	187,500	53,500	21,177	0,519	2,530	3,048	19,637	22,685	2,432
A01-14	7,921	75,700	443,200	163,500	302,500	155,000	20,335	0,134	0,469	0,602	22,949	23,551	3,062
A01-15	7,859	104,000	1005,800	124,800	334,200	155,000	41,630	0,055	0,770	0,824	39,826	40,650	6,399
A01-16	7,937	67,800	1032,700	136,950	267,800	127,000	53,474	0,002	0,987	0,989	41,134	42,123	5,100
A01-17	7,645	154,000	1035,900	272,400	554,000	217,000	40,029	0,019	0,364	0,383	31,568	31,951	4,319
A01-18	7,288	400,000	1103,900	764,400	5556,000	958,000	36,175	0,068	1,039	1,107	60,766	61,873	29,996

Tabla 8.9: Valores obtenidos de las variables fisicoquímicas del efluente. Los asteriscos indican muestreos para los cuales no se obtuvieron datos debido a problemas técnicos con los equipos de medida.

Parámetro	pH	Turbidez	Conductividad	SST	DQO	DBO ₅	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₂ ⁻	N-NO ₃ ⁻	TON	NKjeldahl	NT	PT
Muestras	Unidades	Unidades	Unidades	Unidades	Unidades	Unidades	Unidades	Unidades	Unidades	Unidades	Unidades	Unidades	Unidades
	Ud	UNF	µS/cm	mg/L	mgO ₂ /L	mgO ₂ /L	mgN/L	mgN/L	mgN/L	mgN/L	mgN/L	mgN/L	mgP/L
A09-1	7,336	1,070	619,400	1,000	15,300	2,800	0,100	0,009	14,530	14,539	2,658	17,197	1,851
A09-2	7,479	0,627	860,000	3,800	9,800	0,300	0,337	0,011	12,531	12,542	1,110	13,651	2,699
A09-3	7,500	0,638	1211,700	0,300	53,400	0,300	0,201	0,000	11,258	11,258	1,156	12,413	1,878
A09-4	7,407	0,398	923,200	3,700	19,000	0,000	0,058	0,002	10,075	10,077	-10,077	*	*
A09-5	7,629	*	918,700	0,600	18,600	0,000	*	*	*	*	15,016	15,016	1,169
A09-6	7,558	2,050	879,600	0,000	18,800	0,000	0,031	0,005	15,508	15,513	-0,114	15,399	1,263
A09-7	7,609	0,222	853,900	3,700	15,600	2,500	0,046	0,000	10,073	10,073	-0,266	9,808	1,757
A09-8	7,112	0,143	749,900	0,000	25,700	0,000	0,224	0,004	11,779	11,783	-0,559	11,224	1,547
A09-9	7,591	0,193	548,400	1,240	19,500	0,000	0,098	0,003	5,632	5,635	0,362	5,997	0,833
A09-10	7,589	0,353	613,600	3,640	23,000	0,000	0,340	0,033	9,406	9,439	0,168	9,607	1,218
A09-11	7,640	0,301	493,700	0,000	30,600	0,000	0,057	0,005	6,094	6,099	0,323	6,421	0,513
A09-12	7,566	0,860	748,700	1,550	19,300	0,000	0,048	0,002	11,053	11,055	-0,350	10,705	1,205
A09-13	7,850	0,633	577,400	1,680	24,600	0,000	0,047	0,003	5,210	5,213	0,739	5,952	0,511
A09-14	7,286	0,641	581,300	0,000	20,100	1,100	0,270	0,001	6,604	6,605	-0,409	6,196	1,208
A09-15	7,540	0,272	864,500	0,360	21,200	0,300	0,129	0,002	7,125	7,127	0,459	7,586	0,222
A09-16	7,359	0,242	872,100	0,200	33,000	0,300	0,048	0,000	11,489	11,489	0,105	11,593	0,896
A09-17	7,613	0,267	943,700	0,000	19,800	1,100	5,570	0,058	3,666	3,724	3,471	7,195	0,298
A09-18	7,520	0,481	911,000	0,160	17,500	0,800	0,047	0,006	7,276	7,282	0,082	7,363	0,593

Tabla 8.10: Rendimientos de depuración de los parámetros contemplados en el RD 509/1996. Los asteriscos indican ausencia de datos.

Parámetro	SST	DQO	DBO ₅	NT	PT
Muestras	Unidades	Unidades	Unidades	Unidades	Unidades
	%	%	%	%	%
M1	98,91	91,85	94,03	19,88	16,28
M2	97,61	97,55	99,84	77,02	52,66
M3	99,76	81,11	99,79	72,55	66,89
M4	97,78	94,73	100,00	*	*
M5	99,90	97,42	100,00	70,67	89,30
M6	100,00	92,09	100,00	64,73	73,93
M7	98,33	95,92	98,94	83,48	77,09
M8	100,00	90,78	100,00	77,38	71,63
M9	99,08	95,44	100,00	86,06	82,14
M10	99,41	96,88	100,00	63,84	90,62
M11	100,00	90,58	100,00	82,36	86,26
M12	99,09	94,65	100,00	79,14	74,74
M13	99,01	86,88	100,00	73,76	78,98
M14	100,00	93,36	99,29	73,69	60,54
M15	99,71	93,66	99,81	81,34	96,54
M16	99,85	87,68	99,76	72,48	82,43
M17	100,00	96,43	99,49	77,48	93,11

M18	99,98	99,69	99,92	88,10	98,02
-----	-------	-------	-------	-------	-------

Tabla 8.11: Valores obtenidos para las variables operacionales medidas en la cámara aeróbica. TRC y TRH se obtienen mediante cálculo.

Parámetro	SSLM	SSVLM	V30	pH	T ^a	TRH	TRC	
Muestras	Unidades	(mg/L)	(mg/L)	mL	Ud.	°C	horas	días
M1	3375,000	2245,000	543,000	6,500	12,800	51,312	157,731	
M2	4270,000	2935,000	910,000	6,770	16,700	48,146	157,731	
M3	4520,000	2930,000	873,000	6,720	17,900	46,032	164,040	
M4	3460,000	2185,000	500,000	6,650	21,700	48,690	68,350	
M5	3675,000	2060,000	470,000	6,750	22,400	56,878	51,263	
M6	2196,500	1306,500	325,000	6,700	23,500	68,100	57,761	
M7	2620,000	1465,000	473,000	6,730	22,400	64,156	59,435	
M8	3160,000	1820,000	493,000	6,660	21,700	48,322	59,435	
M9	3140,000	1840,000	660,000	6,680	18,800	65,095	63,092	
M10	3065,000	1950,000	640,000	6,700	13,300	55,959	55,419	
M11	2270,000	1510,000	415,000	6,555	13,286	61,510	58,586	
M12	3195,000	2145,000	780,000	6,615	12,643	64,001	60,309	
M13	2945,000	1680,000	507,500	6,910	11,329	28,503	57,761	
M14	3980,000	2300,000	802,500	6,610	12,043	34,121	57,761	
M15	2995,000	1805,000	880,000	6,735	17,100	53,375	57,761	
M16	4300,000	2190,000	697,500	6,660	18,686	55,047	50,630	
M17	4840,000	2560,000	930,000	6,810	21,871	63,336	59,435	
M18	5300,000	2890,000	900,000	6,600	22,586	68,019	57,761	

Tabla 8.12: Valores de los parámetros operacionales proporcionados por el laboratorio de la EDAR Arroyo Valenoso.

Muestra	SSVLM (%)	SSVLM (mg/L)	V30 (mL)	pH (Ud)	T° (°C)	Caudal tratado (m ³ /día)	Capacidad del tratamiento biológico (m ³)	Caudal de purga (m ³ /día)	TRH (horas)	TRC (Ef) (días)
1	66,5185185	2245	543	6,5	12,8	1918,14286	4101	26	51,31213	157,7
2	68,735363	2935	910	6,77	16,7	2044,28571	4101	26	48,14591	157,7
3	64,8230088	2930	873	6,72	17,9	2138,14286	4101	25	46,03247	164,0
4	63,150289	2185	500	6,65	21,7	2021,42857	4101	60	48,69032	68,4
5	56,0544218	2060	470	6,75	22,4	1730,42857	4101	80	56,87840	51,3
6	59,4809925	1306,5	325	6,7	23,5	1445,28571	4101	71	68,10003	57,8
7	55,9160305	1465	473	6,73	22,4	1534,14286	4101	69	64,15569	59,4
8	57,5949367	1820	493	6,66	21,7	2036,85714	4101	69	48,32150	59,4
9	58,5987261	1840	660	6,68	18,8	1512,00000	4101	65	65,09524	63,1
10	63,6215334	1950	640	6,7	13,30	1758,85714	4101	74	55,95906	55,4
11	66,5198238	1510	415	6,555	13,29	1600,14286	4101	70	61,50951	58,6
12	67,1361502	2145	780	6,615	12,64	1537,85714	4101	68	64,00074	60,3
13	57,0458404	1680	507,5	6,910	11,33	3453,14286	4101	71	28,50273	57,8
14	57,7889447	2300	802,5	6,610	12,04	2884,57143	4101	71	34,12084	57,8
15	60,2671119	1805	880	6,735	17,10	1844,00000	4101	71	53,37527	57,8
16	50,9302326	2190	697,5	6,66	18,69	1788,00000	4101	81	55,04698	50,6
17	52,892562	2560	930	6,81	21,87	1554,00000	4101	69	63,33591	59,4
18	54,5283019	2890	900	6,6	22,59	1447,00000	4101	71	68,01935	57,8
19	72,5321888	3380	900	6,97	21,30	3270,00000	4101	74	30,09908	55,4
20	51,5966387	3070	550	6,68	20,40	2520,00000	4101	154	39,05714	26,6
21	54,6391753	3180	950	6,42	19,60	1507,00000	4101	99	65,31121	41,4
22	54,5105566	2840	900	6,22	15,80	2455,00000	4101	104	40,09124	39,4
23	64,0083945	6100	900	6,31	15,60	1488,00000	4101	15	66,14516	273,4
24	64,6929825	2950	760	6,79	15,30	2147,00000	4101	99	45,84257	41,4

Tabla 8.13: Concentraciones de variables relativas a nitrógeno y fósforo obtenidas en la cámara anóxica. Los asteriscos indican muestreos para los cuales no se obtuvieron datos debido a problemas técnicos con los equipos de medida.

Parámetro	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₂ ⁻	N-NO ₃ ⁻	TON	NKjeldahl	NT	PT
Muestras	Unidades	mgN/L	mgN/L	mgN/L	mgN/L	mgN/L	mgP/L
ANOX1		8,954	0,120	5,302	84,656	5,422	90,078
ANOX2		8,509	0,180	2,785	113,234	2,964	116,198
ANOX3		8,286	0,028	0,756	115,118	0,784	115,902
ANOX4		6,348	0,009	0,618	*	0,627	*
ANOX5		*	*	*	85,992	*	85,992
ANOX6		7,088	0,011	7,632	74,502	7,643	82,144
ANOX7		7,707	0,021	0,882	96,316	0,902	97,218
ANOX8		8,406	0,036	0,709	57,959	0,744	58,703
ANOX9		7,432	0,012	0,548	69,588	0,560	70,147
ANOX10		3,303	0,051	3,567	47,227	3,617	50,844
ANOX11		11,156	0,036	0,121	35,998	0,157	36,154
ANOX12		9,966	0,052	0,600	87,637	0,652	88,289
ANOX13		4,533	0,028	2,628	27,327	2,656	29,982
ANOX14		6,118	0,031	0,295	25,913	0,326	26,238
ANOX15		7,800	0,051	0,884	33,188	0,935	34,123
ANOX16		10,150	0,004	2,930	21,615	2,934	24,549
ANOX17		12,699	0,015	0,395	41,752	0,410	42,162
ANOX18		9,406	0,023	1,293	23,290	1,316	24,606

Tabla 8.14: Concentraciones de variables relativas a nitrógeno y fósforo obtenidas en la cámara aeróbica. Los asteriscos indican muestreos para los cuales no se obtuvieron datos debido a problemas técnicos con los equipos de medida.

Parámetro	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₂ ⁻	N-NO ₃ ⁻	NKjeldahl	TON	NT	PT
Muestras	Unidades	mgN/L	mgN/L	mgN/L	mgN/L	mgN/L	mgP/L
AER 1		0,726	0,010	10,165	78,599	10,175	88,774
AER 2		2,316	0,111	9,601	99,0175	9,7115	108,729
AER 3		0,285	0,002	7,244	108,125	7,2455	115,3705
AER 4		0,678	0,009	7,143	*	7,152	*
AER 5		*	*	*	69,0485	*	69,0485
AER 6		0,295	0,011	14,667	75,7535	14,678	90,4315
AER 7		0,270	0,009	8,059	96,5505	8,068	104,6185
AER 8		0,619	0,031	6,613	66,6915	6,644	73,3355
AER 9		0,171	0,007	4,190	53,9875	4,1965	58,184
AER 10		0,231	0,011	5,767	48,681	5,7775	54,4585
AER 11		1,594	0,132	1,658	31,812	1,7895	33,6015
AER 12		0,081	0,015	7,824	69,7845	7,8385	77,623
AER 13		0,200	0,018	5,220	1,0025	5,2375	6,24
AER 14		0,278	0,016	3,696	15,608	3,7115	19,3195
AER 15		0,567	0,014	3,905	20,3525	3,9185	24,271
AER 16		0,786	0,003	6,688	14,0665	6,6905	20,757
AER 17		5,367	0,018	1,114	18,151	1,132	19,283
AER 18		0,253	0,021	6,185	34,6085	6,206	40,8145

Tabla 8.15: Concentraciones de variables relativas a nitrógeno y fósforo obtenidas en el reactor MBR. Los asteriscos indican muestreos para los cuales no se obtuvieron datos debido a problemas técnicos con los equipos de medida.

Parámetro	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₂ ⁻	N-NO ₃ ⁻	NKjeldahl	TON	NT	PT	
Muestras	Unidades	mgN/L	mgN/L	mgN/L	mgN/L	mgN/L	mgP/L	
MBR 1		57,069	0,657	230,029	-65,619	230,686	165,067	83,69
MBR 2		2,478	0,130	4,184	396,032	4,313	400,345	226,648
MBR 3		1,597	0,000	0,000	299,873	0	299,873	156,2735
MBR 4		5,319	0,015	0,064	*	0,0785	*	*
MBR 5		*	*	*	324,8185	*	324,8185	330,6195
MBR 6		0,353	0,013	15,896	97,415	15,9085	113,3235	73,7605
MBR 7		0,469	0,082	9,338	114,2695	9,4195	123,689	87,853
MBR 8		0,946	0,031	8,130	82,464	8,1605	90,6245	74,468
MBR 9		0,260	0,011	4,197	128,9	4,2075	133,1075	82,312
MBR 10		0,231	0,010	5,107	99,163	5,117	104,28	66,9895
MBR 11		8,515	0,176	0,296	71,748	0,4715	72,2195	93,4655
MBR 12		0,124	0,019	8,287	80,257	8,306	88,563	52,129
MBR 13		0,644	0,027	3,344	83,551	3,371	86,922	68,399
MBR 14		0,386	0,030	2,901	22,8755	2,9305	25,806	81,625
MBR 15		0,557	0,028	3,243	38,4675	3,271	41,7385	152,712
MBR 16		3,187	0,007	0,925	21,554	0,932	22,486	146,5645
MBR 17		4,024	0,031	3,597	19,682	3,628	23,31	88,1015
MBR 18		0,552	0,020	6,395	22,603	6,4145	29,0175	25,157

Tabla 8.16: Decantabilidad, características macroscópicas y microscópicas del fango activo para cada muestreo. Índice de Fango para cada reactor para cada muestreo. A: cámara anóxica; B: cámara aeróbica; C: Reactor MBR.

Muestreo	Decantabilidad (V30 (mL))		
	A	B	C
1	710	330	980
2	870	850	1000
3	870	870	990
4	700	680	1000
5	430	780	1000
6	320	460	850
7	330	610	810
8	360	390	920
9	430	360	960
10	440	460	940
11	560	280	980
12	600	750	840
13	340	0	910
14	820	790	950
15	850	820	980
16	790	800	980
17	270	970	640
18	610	830	960

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS														
Muestreo	A				B					C				
	Turbi- dez	Flóculos en suspensión	Sedimenta- bilidad	Olor	Muestreo	Turbi- dez	Flóculos en suspensión	Sedimenta- bilidad	Olor	Muestreo	Turbi- dez	Flóculos en suspensión	Sedimenta- bilidad	Olor
1	9	9	4,5	0	1	9	9	4,5	3	1	0	0	0	0
2	9	9	0	0	2	9	9	0	3	2	0	0	0	0
3	9	9	0	0	3	9	9	0	3	3	0	4,5	0	3
4	9	9	4,5	0	4	9	9	4,5	3	4	0	0	0	0
5	9	9	4,5	0	5	9	9	4,5	3	5	0	0	0	0
6	4,5	4,5	4,5	3	6	9	9	4,5	3	6	9	9	0	3
7	4,5	9	4,5	0	7	9	9	4,5	3	7	9	9	0	3
8	4,5	4,5	4,5	0	8	9	9	4,5	3	8	9	9	0	3
9	4,5	4,5	4,5	3	9	9	4,5	4,5	3	9	9	9	0	3
10	9	4,5	4,5	0	10	9	9	4,5	3	10	9	9	0	3
11	9	9	4,5	0	11	9	9	9	3	11	9	9	0	3
12	9	9	4,5	0	12	9	9	4,5	3	12	9	9	0	0
13	4,5	4,5	4,5	3	13	4,5	0	9	0	13	9	9	0	3
14	9	9	0	0	14	9	9	4,5	3	14	9	9	0	3
15	9	9	0	0	15	9	9	0	3	15	9	0	0	3
16	9	9	4,5	3	16	9	9	0	3	16	9	9	0	3
17	4,5	4,5	9	0	17	9	9	0	3	17	9	9	4,5	3
18	9	9	4,5	3	18	9	9	0	3	18	9	9	0	3

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	A	Muestreo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
		Forma	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	4	0	0	0	0	0	0	0
		Tamaño	7	7	7	7	7	7	0	0	0	4	0	7	7	7	0	4	0	7	7	7
		Estructura	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
		Textura	4	4	4	4	4	4	4	4	0	4	0	4	4	0	0	0	4	0	0	0
		Cobertura	7	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	7	3,5	3,5	3,5	7	3,5	7	3,5	7	3,5	7	7	7	7
		Filamentos en flóculo	7	0	7	7	14	14	14	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
		Filamentos en disolución	3	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0	3	3	3
		Diversidad de protistas	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
		B	Muestreo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
	Forma	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0	0	0	0	0	4	0	0	
	Tamaño	7	0	4	7	7	7	7	7	4	7	0	7	7	0	7	0	0	4	4	4	
	Estructura	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	18	9	0	9	9	0	18	9	9	
	Textura	4	4	4	4	4	4	4	4	0	4	4	4	4	4	4	0	4	4	4	4	
	Cobertura	7	7	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	7	7	7	7	0	7	7	7	7	7	
	Filamentos en flóculo	7	0	7	7	14	7	14	7	7	7	7	7	7	14	7	7	7	7	7	7	
	Filamentos en disolución	3	3	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0	3	3	3	3	
	Diversidad de protistas	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	7	13	13	13	13	13	
	C	Muestreo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
	Forma	4	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Tamaño	0	7	0	0	0	0	7	7	7	4	0	0	7	7	7	7	0	0	0	0	
	Estructura	9	18	9	9	9	9	9	9	9	9	9	18	0	9	18	0	9	9	9	9	
	Textura	4	4	4	4	0	4	0	0	0	4	4	4	4	0	4	4	4	4	4	4	
	Cobertura	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	7	7	7	7	7	7	3,5	3,5	3,5	
	Filamentos en flóculo	7	7	7	7	14	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	0	7	0	0	
	Filamentos en disolución	3	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0	3	3	3	3	
	Diversidad de protistas	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	

ÍNDICE DE FANGO	Muestreo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
	A	76,5	58,5	65,5	73	80	67	72	53	64	57,5	72,5	64	62,5	53,5	48,5	68,5	64	71,5		
	B	75,5	61	65,5	76	83	76	83	73	67,5	72,5	89	75,5	41,5	75,5	57	55	81	68		
C	43,5	52,5	48	43,5	46,5	64,5	67,5	67,5	67,5	68,5	69,5	52	67	80	43	71	58	53,5			

Tabla 8.17: Media y desviación estándar (DE) del valor medio de gris y de la proporción de bacterias no viables (NV) y bacterias viables (V), en el biorreactor; A: cámara anóxica; B: cámara aeróbica y C: reactor MBR.

A	NV (valor de gris)	V (valor de gris)	NV (%)	V (%)
Media	6,905	25,424	21,359	78,641
DE	6,759	11,712	36,592	63,408
B	NV (valor de gris)	V (valor de gris)	NV (%)	V (%)
Media	7,050	22,718	23,685	76,315
DE	3,875	14,308	21,312	78,688
C	NV (valor de gris)	V (valor de gris)	NV (%)	V (%)
Media	7,444	24,697	23,161	76,839
DE	5,044	13,717	26,883	73,117

Tabla 8.18: Recuento de bacterias viables totales, enterobacterias y pseudomonadáceas en la cámara anóxica. “NAPR”, No Apto Para Recuento.

Muestreo	Medio de cultivo	UFC/mL	Medio de cultivo	UFC/mL	Medio de cultivo	UFC/mL
1	LB	4,56E+06	PSIA	2,72E+04	VRBG	7,24E+05
1	LB	2,46E+06	PSIA	2,06E+04	VRBG	9,00E+05
2	LB	4,60E+06	PSIA	2,60E+03	VRBG	5,80E+04
2	LB	3,20E+06	PSIA	2,80E+03	VRBG	1,72E+05
3	LB	1,24E+06	PSIA	2,00E+03	VRBG	1,76E+05
3	LB	3,18E+06	PSIA	1,40E+03	VRBG	2,36E+05
4	LB	3,94E+06	PSIA	1,00E+03	VRBG	1,48E+05
4	LB	1,04E+06	PSIA	2,00E+02	VRBG	1,66E+05
5	LB	1,52E+06	PSIA	1,00E+03	VRBG	9,20E+04
5	LB	1,88E+06	PSIA	2,00E+02	VRBG	1,14E+05
6	LB	3,00E+05	PSIA	2,00E+03	VRBG	8,40E+04
6	LB	6,80E+05	PSIA	2,60E+03	VRBG	1,44E+05
7	LB	1,42E+06	PSIA	4,00E+03	VRBG	1,80E+04
7	LB	2,30E+06	PSIA	6,00E+03	VRBG	5,60E+04
8	LB	1,17E+06	PSIA	8,00E+03	VRBG	2,40E+05
8	LB	1,40E+06	PSIA	6,00E+03	VRBG	1,22E+05
9	LB	2,52E+06	PSIA	7,20E+03	VRBG	6,00E+05
9	LB	2,18E+06	PSIA	5,80E+03	VRBG	7,36E+05
10	LB	5,02E+06	PSIA	1,20E+04	VRBG	3,10E+05
10	LB	3,84E+06	PSIA	1,14E+04	VRBG	4,50E+05
11	LB	4,54E+06	PSIA	7,80E+03	VRBG	6,40E+04
11	LB	4,22E+06	PSIA	9,00E+03	VRBG	2,00E+04
12	LB	2,80E+06	PSIA	3,20E+03	VRBG	1,96E+05
12	LB	2,40E+06	PSIA	3,80E+03	VRBG	2,78E+05
13	LB	NAPR	PSIA	2,00E+03	VRBG	4,60E+05
13	LB	NAPR	PSIA	5,20E+03	VRBG	1,40E+05
14	LB	2,46E+06	PSIA	9,60E+03	VRBG	7,00E+04
14	LB	2,38E+06	PSIA	1,12E+04	VRBG	6,40E+04
15	LB	1,94E+06	PSIA	8,00E+02	VRBG	1,02E+05
15	LB	1,48E+06	PSIA	2,00E+02	VRBG	1,60E+05
16	LB	1,88E+06	PSIA	1,40E+03	VRBG	2,26E+05
16	LB	2,98E+06	PSIA	6,00E+02	VRBG	2,52E+05
17	LB	1,74E+06	PSIA	1,40E+03	VRBG	9,60E+04
17	LB	3,46E+06	PSIA	8,00E+02	VRBG	6,20E+04
18	LB	1,24E+06	PSIA	1,00E+03	VRBG	2,20E+04
18	LB	6,60E+05	PSIA	6,00E+02	VRBG	4,00E+03

Tabla 8.19: Recuento de bacterias viables totales, enterobacterias y pseudomonadáceas en la cámara aeróbica. “NAPR”, No Apto Para Recuento.

Muestreo	Medio de cultivo	UFC/mL	Medio de cultivo	UFC/mL	Medio de cultivo	UFC/mL
1	LB	1,20E+06	PSIA	1,12E+04	VRBG	1,48E+05
1	LB	9,40E+05	PSIA	1,30E+04	VRBG	2,14E+05
2	LB	2,00E+06	PSIA	1,40E+03	VRBG	6,40E+04
2	LB	9,60E+05	PSIA	6,00E+02	VRBG	1,88E+05
3	LB	9,40E+05	PSIA	8,00E+02	VRBG	7,60E+04
3	LB	3,60E+05	PSIA	1,20E+03	VRBG	6,20E+04
4	LB	1,24E+06	PSIA	8,00E+02	VRBG	8,40E+04
4	LB	1,08E+06	PSIA	1,20E+03	VRBG	9,00E+04
5	LB	8,60E+05	PSIA	3,20E+03	VRBG	1,84E+05
5	LB	4,60E+05	PSIA	1,00E+03	VRBG	2,56E+05
6	LB	3,40E+05	PSIA	6,00E+02	VRBG	9,20E+04
6	LB	4,40E+05	PSIA	1,80E+03	VRBG	2,60E+04
7	LB	9,60E+05	PSIA	2,60E+03	VRBG	8,00E+03
7	LB	7,00E+05	PSIA	4,60E+03	VRBG	4,40E+04
8	LB	3,46E+05	PSIA	3,60E+03	VRBG	2,20E+04
8	LB	3,98E+05	PSIA	1,80E+03	VRBG	1,00E+04
9	LB	9,20E+05	PSIA	4,80E+03	VRBG	1,84E+05
9	LB	1,28E+06	PSIA	5,80E+03	VRBG	2,74E+05
10	LB	4,18E+06	PSIA	1,24E+04	VRBG	2,16E+05
10	LB	3,90E+06	PSIA	1,48E+04	VRBG	2,78E+05
11	LB	2,10E+06	PSIA	8,40E+03	VRBG	2,00E+04
11	LB	2,10E+06	PSIA	6,00E+03	VRBG	8,00E+03
12	LB	1,70E+06	PSIA	3,40E+03	VRBG	1,70E+05
12	LB	7,60E+05	PSIA	1,60E+03	VRBG	9,20E+04
13	LB	1,40E+05	PSIA	0,00E+00	VRBG	4,00E+03
13	LB	4,00E+04	PSIA	0,00E+00	VRBG	0,00E+00
14	LB	3,60E+06	PSIA	4,00E+03	VRBG	0,00E+00
14	LB	1,94E+06	PSIA	3,60E+03	VRBG	0,00E+00
15	LB	9,00E+05	PSIA	1,40E+03	VRBG	8,00E+04
15	LB	7,20E+05	PSIA	2,00E+02	VRBG	2,26E+05
16	LB	9,80E+05	PSIA	1,00E+03	VRBG	9,60E+04
16	LB	9,00E+05	PSIA	0,00E+00	VRBG	8,40E+04
17	LB	4,12E+06	PSIA	3,00E+03	VRBG	1,22E+05
17	LB	0,00E+00	PSIA	1,20E+03	VRBG	1,42E+05
18	LB	4,60E+05	PSIA	2,00E+02	VRBG	1,00E+04
18	LB	1,20E+05	PSIA	0,00E+00	VRBG	0,00E+00

Tabla 8.20: Recuento de bacterias viables totales, enterobacterias y pseudomonádáceas en el reactor MBR. “NAPR”, No Apto Para Recuento.

Muestreo	Medio de cultivo	UFC/mL	Medio de cultivo	UFC/mL	Medio de cultivo	UFC/mL
1	LB	2,92E+06	PSIA	3,28E+04	VRBG	2,58E+05
1	LB	6,30E+06	PSIA	2,56E+04	VRBG	8,24E+05
2	LB	1,48E+07	PSIA	1,30E+04	VRBG	1,08E+06
2	LB	1,58E+07	PSIA	5,80E+03	VRBG	1,46E+06
3	LB	6,60E+06	PSIA	4,80E+03	VRBG	4,60E+05
3	LB	3,20E+06	PSIA	2,60E+03	VRBG	8,00E+04
4	LB	2,80E+06	PSIA	2,00E+03	VRBG	2,20E+05
4	LB	1,40E+06	PSIA	2,60E+03	VRBG	2,00E+05
5	LB	2,24E+06	PSIA	8,80E+03	VRBG	4,22E+05
5	LB	7,78E+06	PSIA	5,00E+03	VRBG	4,12E+05
6	LB	2,20E+05	PSIA	6,00E+02	VRBG	2,60E+04
6	LB	1,26E+06	PSIA	6,00E+02	VRBG	4,38E+05
7	LB	6,20E+05	PSIA	5,40E+03	VRBG	3,20E+04
7	LB	2,30E+06	PSIA	9,60E+03	VRBG	2,80E+04
8	LB	5,96E+05	PSIA	3,20E+03	VRBG	1,86E+05
8	LB	6,18E+05	PSIA	4,00E+03	VRBG	1,26E+05
9	LB	2,32E+06	PSIA	7,40E+03	VRBG	7,66E+05
9	LB	4,58E+06	PSIA	6,80E+03	VRBG	8,78E+05
10	LB	8,24E+06	PSIA	2,28E+04	VRBG	4,38E+05
10	LB	1,60E+07	PSIA	2,34E+04	VRBG	1,25E+06
11	LB	8,00E+06	PSIA	2,40E+04	VRBG	3,80E+04
11	LB	7,20E+06	PSIA	2,66E+04	VRBG	8,40E+04
12	LB	1,46E+06	PSIA	1,40E+03	VRBG	1,10E+05
12	LB	1,64E+06	PSIA	2,40E+03	VRBG	1,84E+05
13	LB	5,14E+06	PSIA	1,32E+04	VRBG	6,00E+05
13	LB	0,00E+00	PSIA	7,80E+03	VRBG	5,78E+05
14	LB	5,46E+06	PSIA	4,00E+03	VRBG	5,20E+04
14	LB	3,94E+06	PSIA	9,00E+03	VRBG	0,00E+00
15	LB	1,72E+06	PSIA	1,16E+04	VRBG	8,00E+04
15	LB	1,56E+06	PSIA	2,00E+03	VRBG	1,40E+05
16	LB	1,28E+06	PSIA	3,80E+03	VRBG	2,26E+05
16	LB	1,50E+06	PSIA	8,00E+02	VRBG	1,16E+05
17	LB	4,56E+06	PSIA	1,20E+03	VRBG	4,40E+04
17	LB	1,54E+06	PSIA	6,00E+02	VRBG	2,00E+04
18	LB	1,02E+06	PSIA	0,00E+00	VRBG	6,00E+03
18	LB	2,20E+06	PSIA	0,00E+00	VRBG	2,80E+04

Tabla 8.21: Número de individuos, taxones y su proporción. Resultados provenientes de aquellas especies cuya frecuencia de aparición era igual o superior al 15%. A: Reactor anóxico; B: Reactor aeróbico; C: Reactor MBR.

A	Individuos	Proporción	B	Individuos	Proporción	C	Individuos	Proporción
Amebas desnudas	1320	2,43%	Amebas desnudas	740	1,45%	Amebas desnudas	860	1,51%
Amebas testáceas	10020	18,47%	Amebas testáceas	9440	18,45%	Amebas testáceas	7140	12,57%
Ciliados nadadores	760	1,40%	Ciliados nadadores	1080	2,11%	Ciliados nadadores	1660	2,92%
Ciliados reptantes	27740	51,12%	Ciliados reptantes	27780	54,30%	Ciliados reptantes	28420	50,02%
Ciliados sésiles	9500	17,51%	Ciliados sésiles	6620	12,94%	Ciliados sésiles	12600	22,18%
Grandes flagelados	1160	2,14%	Grandes flagelados	1460	2,85%	Grandes flagelados	1320	2,32%
Micrometazoos	900	1,66%	Micrometazoos	1280	2,50%	Micrometazoos	1360	2,39%
Otros	0	0,00%	Otros	100	0,20%	Otros	280	0,49%
Pequeños flagelados	2860	5,27%	Pequeños flagelados	2660	5,20%	Pequeños flagelados	3180	5,60%

A	Taxones	Proporción	B	Taxones	Proporción	C	Taxones	Proporción
Amebas desnudas	2	6,90%	Amebas desnudas	2	6,90%	Amebas desnudas	2	7,41%
Amebas testáceas	3	10,34%	Amebas testáceas	4	13,79%	Amebas testáceas	3	11,11%
Ciliados nadadores	2	6,90%	Ciliados nadadores	2	6,90%	Ciliados nadadores	2	7,41%
Ciliados reptantes	5	17,24%	Ciliados reptantes	5	17,24%	Ciliados reptantes	4	14,81%
Ciliados sésiles	12	41,38%	Ciliados sésiles	9	31,03%	Ciliados sésiles	10	37,04%
Grandes flagelados	2	6,90%	Grandes flagelados	3	10,34%	Grandes flagelados	2	7,41%
Micrometazoos	2	6,90%	Micrometazoos	2	6,90%	Micrometazoos	2	7,41%
Otros	0	0,00%	Otros	1	3,45%	Otros	1	3,70%
Pequeños flagelados	1	3,45%	Pequeños flagelados	1	3,45%	Pequeños flagelados	1	3,70%

Tabla 8.22: Clasificación de protistas y micrometazoos

Grupo	Grupo Funcional	Grupo taxonómico (nivel Clase)	Género/especie
FLAGELADOS	Pequeños flagelados	-	<i>Bodo saltans</i>
		-	<i>Astasia sp</i>
	Grandes flagelados	-	<i>Distigma sp</i>
		-	<i>Entosiphon sp</i>
		-	<i>Euglena sp</i>
		-	<i>Notosolenus sp</i>
		-	<i>Peranema sp</i>
		-	<i>Petalomonas sp</i>
AMEBAS	Amebas desnudas	-	<i>Rhabdomonas sp</i>
		-	Ameba radiosa
		-	Amebas desnudas < 20 micras
		-	Amebas desnudas 20-50 micras
	Amebas testáceas	-	Amebas desnudas > 50 micras
		-	<i>Arcella sp</i>
		-	<i>Centropyxis sp</i>
		-	<i>Euglypha sp</i>
CILIADOS	Nadador	-	<i>Trinema sp</i>
		Prostómido	<i>Dexiotrichia sp</i>
		Prostómido	<i>Holophrya sp</i>
		Prostómido	<i>Plagiocampa sp</i>
		Prostómido	<i>Plagiopyla sp</i>
		Oligohimenóforo (Escuticociliado)	<i>Prorodon sp</i>
	Reptante	Oligohimenóforo (Escuticociliado)	<i>Spirostomon sp</i>
		Heterotrico	<i>Uronema sp</i>
		Litostomado	<i>Acineria uncinata</i>
		Litostomado	<i>Aspidisca cicada</i>
		Filofaríngeo	<i>Aspidisca lynceus</i>
		Filofaríngeo	<i>Chilodonella sp</i>
		Filofaríngeo	<i>Euplotes sp</i>
		Espirotrico	<i>Litonotus sp</i>
		Espirotrico	<i>Pseudochilodonopsis sp</i>
		Espirotrico	<i>Trochilia minuta sp</i>
	Sésil	Oligohimenóforo (Peritrico)	<i>Epistylis sp</i>
		Oligohimenóforo (Peritrico)	<i>Epistylis spp</i>
		Oligohimenóforo (Peritrico)	<i>Metacystis sp</i>
		Prostómido	<i>Opercularia sp</i>
		Oligohimenóforo (Peritrico)	<i>Stentor sp</i>
		Oligohimenóforo (Peritrico)	<i>Thuricola sp</i>
		Oligohimenóforo (Peritrico)	<i>Vaginicola sp</i>
		Oligohimenóforo (Peritrico)	complejo <i>Vorticella aquadulcis</i>
		Oligohimenóforo (Peritrico)	<i>Vorticella campanula</i>
		Oligohimenóforo (Peritrico)	complejo <i>Vorticella convallaria</i>
		Oligohimenóforo (Peritrico)	complejo <i>Vorticella microstomon</i>
		Oligohimenóforo (Peritrico)	<i>Vorticella sp</i>
		Oligohimenóforo (Peritrico)	<i>Vorticella spp</i>
		Oligohimenóforo (Peritrico)	<i>Vorticella striata</i>
Oligohimenóforo (Peritrico)	<i>Zoothamnium sp</i>		
Sésil	Filofaríngeo (Suctor)	<i>Acineta sp</i>	
	Filofaríngeo (Suctor)	<i>Tokophrya sp</i>	
MICROMETAZOOS	Artrópodos		Ácaro
	Rotíferos		Rotíferos
	Gastrotrico		Gastrotrico
	Nemátodo		Nemátodo
OTROS	Otros 1		Otros 1
	Otros 3		Otros 3
	Otros 4		Otros 4
	Otros 5		Otros 5
	Otros 6		Otros 6
	Otros 7		Otros 7
	Otros 8		Otros 8
	Otros 9		Otros 9
	Otros 10		Otros 10

Tabla 8.23: Correspondencia entre el código de taxón (CT) y su identificación (nombre genérico o específico).

CT	Identificación	CT	Identificación
Sp1	<i>Bodo saltans</i>	Sp32	<i>Trochilia minuta</i>
Sp2	<i>Astasia sp</i>	Sp33	<i>Epistylis spp</i>
Sp3	<i>Distigma sp</i>	Sp34	<i>Epistylis sp</i>
Sp4	<i>Entosiphon sp</i>	Sp35	<i>Metacystis sp</i>
Sp5	<i>Euglena sp</i>	Sp36	<i>Opercularia sp</i>
Sp6	<i>Notosolenus sp</i>	Sp37	<i>Stentor sp</i>
Sp7	<i>Peranema sp</i>	Sp38	<i>Thuricola sp</i>
Sp8	<i>Petalomonas sp</i>	Sp39	<i>Vaginicola sp</i>
Sp9	<i>Rhabdomonas sp</i>	Sp40	complejo <i>Vorticella aquadulcis</i>
Sp10	Ameba radiosa	Sp41	<i>Vorticella campanula</i>
Sp11	Amebas desnudas < 20 micras	Sp42	complejo <i>Vorticella convallaria</i>
Sp12	Amebas desnudas 20-50 micras	Sp43	complejo <i>Vorticella microstomun</i>
Sp13	Amebas desnudas > 50 micras	Sp44	<i>Vorticella sp</i>
Sp14	<i>Arcella sp</i>	Sp45	<i>Vorticella spp</i>
Sp15	<i>Centropyxis sp</i>	Sp46	<i>Vorticella striata</i>
Sp16	<i>Euglypha sp</i>	Sp47	<i>Zoothamnium sp</i>
Sp17	<i>Trinema sp</i>	Sp48	<i>Acineta sp</i>
Sp18	<i>Dexiotrichia sp</i>	Sp49	<i>Tokophrya sp</i>
Sp19	<i>Holophrya sp</i>	Sp50	Ácaro
Sp20	<i>Plagiocampa sp</i>	Sp51	Rotíferos
Sp21	<i>Plagiopyla sp</i>	Sp52	Gastrotrico
Sp22	<i>Prorodon sp</i>	Sp53	Nemátodo
Sp23	<i>Spirostomun sp</i>	Sp54	Otros 1
Sp24	<i>Uronema sp</i>	Sp55	Otros 3
Sp25	<i>Acineria uncinata</i>	Sp56	Otros 4
Sp26	<i>Aspidisca cicada</i>	Sp57	Otros 5
Sp27	<i>Aspidisca lynceus</i>	Sp58	Otros 6
Sp28	<i>Chilodonella sp</i>	Sp59	Otros 7
Sp29	<i>Euplotes sp</i>	Sp60	Otros 8
Sp30	<i>Litonotus sp</i>	Sp61	Otros 9
Sp31	<i>Pseudochilodonopsis sp</i>	Sp62	Otros 10

Tabla 8.24: Abundancia absoluta (ind/mL) de protistas y micrometazoos en la cámara anóxica para cada muestreo.

Taxón	M 1	M 2	M3	M 4	M 5	M6	M 7	M 8	M 9	M1 0	M1 1	M1 2	M1 3	M1 4	M15	M1 6	M1 7	M1 8
<i>Bodo saltans</i>	50 0	40	80	60	12 0	20	60	10 0	38 0	240	160	140	200	80	80	100	220	280
<i>Entosiphon sp</i>	26 0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	100	0	0
<i>Euglena sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
<i>Notosolenus sp</i>	20	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Peranema sp</i>	0	40	0	40	0	160	60	60	80	60	0	0	20	0	220	0	20	0
<i>Petalomonas sp</i>	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0
Amebas desnudas < 20 micras	0	0	0	0	0	0	0	20	0	20	20	20	140	200	40	0	0	0
Amebas desnudas 20-50 micras	14 0	18 0	60	0	10 0	60	20	0	40	0	20	40	0	120	20	60	0	0
Amebas desnudas > 50 micras	0	0	0	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
<i>Arcella sp</i>	0	0	60	76 0	84 0	112 0	32 0	16 0	26 0	140	0	0	60	80	240	380	280	360
<i>Centropyxis sp</i>	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Euglypha sp</i>	0	14 0	300	64 0	70 0	680	20	20	40	60	20	0	120	280	240	380	320	260
<i>Trinema sp</i>	0	0	20	56 0	20	0	60	0	0	0	0	0	0	0	0	80	0	0
<i>Dexiotrichia sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0	0
<i>Plagiocampa sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0	140	0	200	20	100	60
<i>Plagiopyla sp</i>	0	0	0	0	0	0	20	40	0	0	0	0	0	0	0	0	20	120
<i>Prorodon sp</i>	0	0	0	0	0	0	60	0	0	60	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Uronema sp</i>	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Acineria uncinata</i>	24 0	0	0	0	16 0	380	0	24 0	42 0	220	280	260	160	940	1880	40	740	60
<i>Aspidisca cicada</i>	20	40	0	12 0	60	120	28 0	42 0	0	120	300	820	120	360	800	60	660	300
<i>Aspidisca lynceus</i>	0	0	340	40	0	0	0	0	60	0	300	340	0	300	20	0	0	0
<i>Chilodonella sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	20	0	0	0	0
<i>Pseudochilodonopsis sp</i>	60	0	0	0	40	0	0	0	0	60	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Trochilia minuta sp</i>	40	0	0	0	12 0	180	0	0	0	20	40	40	300	720	1098 0	286 0	140	120
<i>Epistylis spp</i>	0	0	122 0	20	20	0	38 0	18 0	0	0	280	660	0	196 0	120	0	40	0
<i>Metacystis sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0
<i>Opercularia sp</i>	0	0	20	20	0	0	0	0	0	0	0	80	0	0	0	0	0	60
<i>Stentor sp</i>	0	0	0	0	0	0	20	20	0	40	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Thuricola sp</i>	0	0	0	24 0	26 0	140	0	0	0	80	0	0	40	0	20	0	0	0
<i>Vaginicola sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	30 0	60	40	0	0	0	0	0	0	0	40
<i>Vorticella campanula</i>	0	0	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
complejo <i>Vorticella convallaria</i>	0	10 0	60	0	12 0	60	12 0	60	0	40	0	140	40	60	180	60	20	100
complejo <i>Vorticella microstromun</i>	32 0	0	160	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0
<i>Vorticella sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	20	20	0	0	0
<i>Vorticella spp</i>	0	40	0	0	20	0	40	20	20	0	180	0	0	0	20	80	0	0
<i>Vorticella striata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	140	400	40	40	20	0	0
<i>Zoothamnium sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0
<i>Acineta sp</i>	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	0	0
<i>Tokophrya sp</i>	0	0	20	0	0	0	0	0	16 0	0	0	20	0	20	40	20	0	0
Ácaro	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rotíferos	0	60	160	80	18 0	40	20	40	20	0	0	20	40	20	40	20	0	20
Nemátodo	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0	0	0	20	60	20	0	0	0
Otros 3	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0	20	0	0	0	0	0	0	0
Otros 4	0	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Otros 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0	0

Tabla 8.25: Media, desviación estándar (DE) y rango de la abundancia absoluta (ind/mL) de protistas y micrometazoos en la cámara anóxica.

Especie/Género/Grupo	Media \pm DE	Rango
<i>Bodo saltans</i>	159 \pm 127	20-500
<i>Entosiphon sp</i>	22 \pm 64	0-260
<i>Euglena sp</i>	1 \pm 5	0-20
<i>Notosolenus sp</i>	2 \pm 6	0-20
<i>Peranema sp</i>	42 \pm 61	0-220
<i>Petalomonas sp</i>	2 \pm 6	0-20
Amebas desnudas < 20 micras	26 \pm 55	0-200
Amebas desnudas 20-50 micras	48 \pm 55	0-180
Amebas desnudas > 50 micras	4 \pm 15	0-60
<i>Arcella sp</i>	281 \pm 321	0-1120
<i>Centropyxis sp</i>	1 \pm 5	0-20
<i>Euglypha sp</i>	234 \pm 237	0-700
<i>Trinema sp</i>	41 \pm 132	0-560
<i>Dexiotrichia sp</i>	2 \pm 9	0-40
<i>Plagiocampa sp</i>	31 \pm 58	0-200
<i>Plagiopyla sp</i>	11 \pm 29	0-120
<i>Prorodon sp</i>	7 \pm 19	0-60
<i>Uronema sp</i>	2 \pm 9	0-40
<i>Acineria uncinata</i>	334 \pm 463	0-1880
<i>Aspidisca cicada</i>	256 \pm 266	0-820
<i>Aspidisca lynceus</i>	78 \pm 135	0-340
<i>Chilodonella sp</i>	2 \pm 6	0-20
<i>Pseudochilodonopsis sp</i>	9 \pm 21	0-60
<i>Trochilia minuta sp</i>	864 \pm 2612	0-10980
<i>Epistylis spp</i>	271 \pm 527	0-1960
<i>Metacystis sp</i>	1 \pm 5	0-20
<i>Opercularia sp</i>	10 \pm 23	0-80
<i>Stentor sp</i>	4 \pm 11	0-40
<i>Thuricola sp</i>	43 \pm 84	0-260
<i>Vaginicola sp</i>	24 \pm 71	0-300
<i>Vorticella campanula</i>	2 \pm 9	0-40
complejo <i>Vorticella convallaria</i>	64 \pm 53	0-180
complejo <i>Vorticella microstomun</i>	28 \pm 82	0-320
<i>Vorticella sp</i>	4 \pm 9	0-20
<i>Vorticella spp</i>	23 \pm 45	0-180
<i>Vorticella striata</i>	36 \pm 97	0-400
<i>Zoothamnium sp</i>	3 \pm 14	0-60
<i>Acineta sp</i>	3 \pm 8	0-20
<i>Tokophrya sp</i>	16 \pm 38	0-160
Ácaro	1 \pm 5	0-20
Rotíferos	42 \pm 51	0-180
Nemátodo	8 \pm 17	0-60
Otros 3	3 \pm 10	0-40
Otros 4	3 \pm 14	0-60

Otros 10	2±9	0-40
----------	-----	------

Tabla 8.26: Abundancia absoluta (ind/mL) de protistas y micrometazoos en la cámara aeróbica para cada muestreo.

Muestreo	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7	M 8	M 9	M 10	M 11	M 12	M 13	M 14	M 15	M 16	M 17	M 18
<i>Bodo saltans</i>	40	100	20	80	40	20	60	120	480	340	160	120	400	80	160	120	180	140
<i>Entosiphon sp</i>	500	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	80	0	0
<i>Euglena sp</i>	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20
<i>Notosolenus sp</i>	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60
<i>Peranema sp</i>	0	40	0	40	20	160	20	120	0	0	80	40	20	0	160	20	20	40
<i>Petalomonas sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0
Ameba radiosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
Amebas desnudas < 20 micras	20	0	0	0	0	0	20	0	0	20	20	40	0	80	40	0	0	0
Amebas desnudas 20-50 micras	40	120	0	0	20	20	40	0	60	0	40	0	0	100	0	20	0	40
<i>Arcella sp</i>	0	0	80	680	1140	1100	300	160	240	60	0	40	0	40	120	440	480	320
<i>Centropyxis sp</i>	0	0	0	20	0	0	40	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0
<i>Euglypha sp</i>	0	20	20	660	780	500	80	20	0	20	0	0	0	100	200	300	400	200
<i>Trinema sp</i>	0	0	180	520	60	0	20	20	0	20	0	40	0	0	0	0	0	0
<i>Holophrya sp</i>	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Plagiocampa sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	140	100	220	40	80	60	40	80	100
<i>Plagiopyla sp</i>	0	0	0	80	0	0	40	40	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Prorodon sp</i>	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Acinera uncinata</i>	180	0	80	60	40	440	100	120	100	140	200	420	0	1500	2020	40	1900	320
<i>Aspidisca cicada</i>	60	160	320	20	0	0	500	580	0	260	340	340	0	520	1020	100	1580	460
<i>Aspidisca lynceus</i>	0	20	0	0	60	200	0	0	0	40	260	800	0	80	0	0	360	0
<i>Chilodonella sp</i>	100	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0
<i>Euplotes sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
<i>Litonotus sp</i>	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudochilodonopsis sp</i>	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Trochilia minuta sp</i>	0	0	0	0	160	100	20	0	0	40	0	140	0	540	8160	2320	120	220
<i>Epistylis spp</i>	0	1100	920	100	20	0	20	0	0	0	20	240	0	60	0	0	0	0
<i>Opercularia sp</i>	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	140	0	0	0	0
<i>Stentor sp</i>	0	0	0	0	0	20	20	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Thuricola sp</i>	0	0	0	220	200	80	0	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Vaginicola sp</i>	0	0	320	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	100	120
complejo <i>Vorticella aquadulcis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0	0	0
complejo <i>Vorticella convallaria</i>	240	40	80	180	60	20	40	0	0	0	120	0	0	80	140	0	20	40
<i>Vorticella sp</i>	0	0	40	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0
<i>Vorticella spp</i>	0	20	0	0	0	40	40	0	20	0	240	0	0	0	160	0	0	60
<i>Vorticella striata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	460	20	120	20	60	0	0

<i>Zoothamnium sp</i>	0	0	0	0	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Acineta sp</i>	20	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Tokophrya sp</i>	0	0	0	0	20	0	0	20	60	0	0	0	0	0	0	0	40	20
Rotíferos	0	20 0	20 0	60	24 0	20	20	0	0	60	20	20	0	0	40	80	10 0	10 0
Nemátodo	0	0	20	20	0	0	0	0	20	0	20	0	0	0	0	20	0	20
Otros 6	0	0	0	0	0	0	0	0	16 0	0	20	0	0	0	0	0	0	0
Otros 7	0	0	0	0	20	0	0	0	20	20	20	20	0	0	0	0	0	0
Otros 10	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 8.27: Media, desviación estándar (DE) y rango de la abundancia absoluta (ind/mL) de protistas y micrometazoos en la cámara aeróbica.

Especie/Género/Grupo	Media ± DE	Rango
<i>Bodo saltans</i>	148±131	20-480
<i>Entosiphon sp</i>	33±118	0-500
<i>Euglena sp</i>	4±11	0-40
<i>Notosolenus sp</i>	4±15	0-60
<i>Peranema sp</i>	43±52	0-160
<i>Petalomonas sp</i>	1±5	0-20
Ameba radiosa	1±5	0-20
Amebas desnudas < 20 micras	13±22	0-80
Amebas desnudas 20-50 micras	28±36	0-120
<i>Arcella sp</i>	289±359	0-1140
<i>Centropyxis sp</i>	4±11	0-40
<i>Euglypha sp</i>	183±247	0-780
<i>Trinema sp</i>	48±126	0-520
<i>Holophrya sp</i>	1±5	0-20
<i>Plagiocampa sp</i>	48±63	0-220
<i>Plagiopyla sp</i>	12±25	0-80
<i>Prorodon sp</i>	3±14	0-60
<i>Acineta uncinata</i>	426±655	0-2020
<i>Aspidisca cicada</i>	348±411	0-1580
<i>Aspidisca lynceus</i>	101±204	0-800
<i>Chilodonella sp</i>	12±32	0-100
<i>Euplotes sp</i>	1±5	0-20
<i>Litonotus sp</i>	1±5	0-20
<i>Pseudochilodonopsis sp</i>	1±5	0-20
<i>Trochilia minuta sp</i>	657±1950	0-8160
<i>Epistylis spp</i>	138±324	0-1100
<i>Opercularia sp</i>	26±76	0-300
<i>Stentor sp</i>	4±11	0-40
<i>Thuricola sp</i>	31±69	0-220
<i>Vaginicola sp</i>	31±80	0-320
complejo <i>Vorticella aquadulcis</i>	2±9	0-40
complejo <i>Vorticella convallaria</i>	59±70	0-240
<i>Vorticella sp</i>	8±25	0-100
<i>Vorticella spp</i>	32±65	0-240
<i>Vorticella striata</i>	38±110	0-460
<i>Zoothamnium sp</i>	3±14	0-60
<i>Acineta sp</i>	2±6	0-20
<i>Tokophrya sp</i>	9±17	0-60
Rotíferos	64±77	0-240
Nemátodo	7±10	0-20
Otros 6	10±38	0-160
Otros 7	6±9	0-20

Otros 10	1±5	0-20
----------	-----	------

Tabla 8.28: Abundancia absoluta (ind/mL) de protistas y micrometazoos en el reactor MBR para cada muestreo.

Taxón	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7	M 8	M 9	M 10	M 11	M 12	M 13	M 14	M 5	M 16	M 17	M 18
<i>Bodo saltans</i>	340	80	120	140	180	20	100	140	760	220	40	100	220	100	180	40	220	180
<i>Astasia sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Distigma sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0	0	0
<i>Entosiphon sp</i>	180	40	20	0	0	0	20	0	0	0	0	0	20	0	20	20	0	0
<i>Euglena sp</i>	0	0	20	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Notosolenus sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0
<i>Peranema sp</i>	0	20	0	0	20	40	80	140	180	120	0	40	0	60	120	120	0	60
<i>Rhabdomonas sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0
Ameba radiosa	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amebas desnudas < 20 micras	0	0	0	0	0	0	80	0	0	0	60	20	0	120	0	0	0	0
Amebas desnudas 20-50 micras	0	120	40	0	0	0	0	60	20	0	40	0	40	180	60	20	0	0
Amebas desnudas > 50 micras	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20
<i>Arcella sp</i>	0	0	180	680	0	880	180	340	260	20	0	40	140	80	20	20	340	340
<i>Centropyxis sp</i>	0	0	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Euglypha sp</i>	20	60	0	1020	680	280	0	60	20	20	40	40	20	140	20	380	220	160
<i>Trinema sp</i>	0	0	20	320	40	0	20	0	0	0	20	0	0	0	20	0	0	0
<i>Plagiocampa sp</i>	0	0	0	20	0	0	0	100	0	60	260	20	500	100	160	80	0	100
<i>Plagiopyla sp</i>	0	0	0	40	0	0	40	120	0	0	0	0	0	0	0	0	40	20
<i>Spirostomon sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0	0
<i>Acineta uncinata</i>	360	0	440	0	20	320	0	560	100	180	240	560	280	1520	760	60	0	500
<i>Aspidisca cicada</i>	60	80	460	0	60	0	460	980	580	340	1040	160	140	300	1320	120	100	740
<i>Aspidisca lynceus</i>	0	40	0	40	0	180	0	0	0	100	500	980	0	580	0	0	40	20
<i>Chilodonella sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0
<i>Euplotes sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudochilodonopsis sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	180	0	0	0	0
<i>Trochilia minuta sp</i>	0	0	0	0	0	40	0	0	0	40	40	0	340	840	10920	380	140	360
<i>Epistylis spp</i>	20	540	1840	280	40	0	60	40	0	0	100	20	0	40	380	0	0	420
<i>Epistylis sp</i>	0	0	0	0	920	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Opercularia sp</i>	540	0	0	0	280	0	0	0	0	0	100	40	0	0	0	0	0	0
<i>Stentor sp</i>	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
<i>Thuricola sp</i>	0	0	120	120	20	80	100	140	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
<i>Vaginicola sp</i>	0	0	840	0	60	40	40	0	160	0	0	0	0	0	0	0	60	120
complejo <i>Vorticella aquadulcis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0
complejo <i>Vorticella convallaria</i>	0	240	40	0	60	20	80	240	180	120	1920	60	20	120	180	140	0	80
complejo <i>Vorticella microstomon</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	120	0	0	0	0	0	0	0
<i>Vorticella sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	20	20	0	0	40
<i>Vorticella spp</i>	80	20	20	0	0	0	20	40	0	20	520	0	0	0	380	0	20	0
<i>Vorticella striata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	440	120	0	160	0	0
<i>Zoothamnium sp</i>	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Acineta sp</i>	0	20	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	20	0	0	0

<i>Tokophrya sp</i>	0	10 0	0	0	20	0	0	20	0	0	20	0	0	20	60	10 0	0	20
Rotíferos	20	18 0	20	14 0	26 0	0	0	20	20	0	12 0	12 0	20	0	20	20	80	40
Gastrotrico	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nemátodo	0	60	20	0	60	0	0	0	0	20	20	20	0	80	0	0	0	0
Otros 1	0	0	0	20	0	0	22 0	0	0	20	0	0	0	0	20	0	0	0
Otros 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0
Otros 5	38 0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	0	0	0	0	0
Otros 8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0
Otros 9	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Otros 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 8.29: Media, desviación estándar (DE) y rango de la abundancia absoluta (ind/mL) de protistas y micrometazoos en el reactor MBR.

Muestreo	Media ± DE	Rango
<i>Bodo saltans</i>	177±166	20-760
<i>Astasia sp</i>	1±5	0-20
<i>Distigma sp</i>	2±9	0-40
<i>Entosiphon sp</i>	18±42	0-180
<i>Euglena sp</i>	2±6	0-20
<i>Notosolenus sp</i>	1±5	0-20
<i>Peranema sp</i>	56±58	0-180
<i>Rhabdomonas sp</i>	1±5	0-20
Ameba radiosa	1±5	0-20
Amebas desnudas < 20 micras	16±35	0-120
Amebas desnudas 20-50 micras	32±49	0-180
Amebas desnudas > 50 micras	2±6	0-20
<i>Arcella sp</i>	196±249	0-880
<i>Centropyxis sp</i>	2±9	0-40
<i>Euglypha sp</i>	177±273	0-1020
<i>Trinema sp</i>	24±75	0-320
<i>Plagiocampa sp</i>	78±127	0-500
<i>Plagiopyla sp</i>	14±31	0-120
<i>Spirostomon sp</i>	2±9	0-40
<i>Acineta uncinata</i>	328±379	0-1520
<i>Aspidisca cicada</i>	386±399	0-1320
<i>Aspidisca lynceus</i>	138±271	0-980
<i>Chilodonella sp</i>	1±5	0-20
<i>Euplotes sp</i>	1±5	0-20
<i>Pseudochilodonopsis sp</i>	11±42	0-180
<i>Trochilia minuta sp</i>	728±2553	0-10920
<i>Epistylis spp</i>	210±441	0-1840
<i>Epistylis sp</i>	51±217	0-920
<i>Opercularia sp</i>	53±139	0-540
<i>Stentor sp</i>	2±6	0-20
<i>Thuricola sp</i>	33±52	0-140
<i>Vaginicola sp</i>	73±197	0-840
complejo <i>Vorticella aquadulcis</i>	1±5	0-20
complejo <i>Vorticella convallaria</i>	194±438	0-1920
complejo <i>Vorticella microstomon</i>	7±28	0-120
<i>Vorticella sp</i>	8±17	0-60
<i>Vorticella spp</i>	62±145	0-520
<i>Vorticella striata</i>	42±109	0-440
<i>Zoothamnium sp</i>	6±24	0-100
<i>Acineta sp</i>	3±8	0-20
<i>Tokophrya sp</i>	20±33	0-100
Rotíferos	60±75	0-260
Gastrotrico	1±5	0-20
Nemátodo	16±25	0-80
Otros 1	16±52	0-220
Otros 4	1±5	0-20

Otros 5	24±90	0-380
Otros 8	1±5	0-20
Otros 9	1±5	0-20
Otros 10	1±5	0-20

Tabla 8.30: Índices de diversidad alfa para los tres reactores biológicos. A: Reactor anóxico; B: Reactor aeróbico; C: Reactor MBR.

A						
Muestra	N.º taxones	N.º individuos	Dominancia (D)	Simpson (1-D)	Shannon (H')	Uniformidad (E)
1	11	83	0,1833	0,8167	1,917	0,618
2	9	33	0,1662	0,8338	1,973	0,7989
3	13	126	0,2778	0,7222	1,755	0,4448
4	12	132	0,1995	0,8005	1,868	0,5398
5	15	140	0,1763	0,8237	2,102	0,5455
6	12	149	0,221	0,779	1,849	0,5297
7	17	78	0,1479	0,8521	2,255	0,5607
8	14	84	0,1431	0,8569	2,19	0,6385
9	13	82	0,1624	0,8376	2,096	0,6259
10	14	60	0,1156	0,8844	2,37	0,7642
11	13	84	0,1417	0,8583	2,118	0,6393
12	17	141	0,1715	0,8285	2,114	0,4871
13	15	91	0,1187	0,8813	2,353	0,7009
14	17	264	0,2016	0,7984	2,009	0,4385
15	22	763	0,5368	0,4632	1,148	0,1432
16	19	221	0,4362	0,5638	1,485	0,2325
17	11	128	0,1899	0,8101	1,885	0,599
18	14	91	0,1262	0,8738	2,272	0,6926

B						
Muestra	N.º taxones	N.º individuos	Dominancia (D)	Simpson (1-D)	Shannon (H')	Uniformidad (E)
1	10	75	0,1989	0,8011	1,853	0,6382
2	11	92	0,3854	0,6146	1,461	0,3917
3	12	114	0,2204	0,7796	1,88	0,5459
4	15	138	0,1683	0,8317	2,078	0,5323
5	18	150	0,2281	0,7719	1,943	0,3877
6	14	137	0,2317	0,7683	1,829	0,4447
7	21	75	0,1669	0,8331	2,341	0,495
8	12	66	0,2374	0,7626	1,877	0,5447
9	11	62	0,2185	0,7815	1,858	0,583
10	12	58	0,1742	0,8258	2,024	0,6307
11	17	85	0,1183	0,8817	2,364	0,6253
12	16	153	0,139	0,861	2,247	0,591
13	4	24	0,7049	0,2951	0,6238	0,4665
14	15	181	0,2223	0,7777	2,003	0,494
15	14	617	0,4719	0,5281	1,2	0,2371
16	14	183	0,4264	0,5736	1,406	0,2915
17	15	271	0,2282	0,7718	1,84	0,4197
18	18	115	0,1082	0,8918	2,471	0,6577

C						
Muestra	N.º taxones	N.º individuos	Dominancia (D)	Simpson (1-D)	Shannon (H')	Uniformidad (E)
1	10	100	0,1812	0,8188	1,868	0,6474
2	14	80	0,1681	0,8319	2,159	0,6188
3	15	210	0,2587	0,7413	1,742	0,3804
4	11	141	0,219	0,781	1,811	0,5558
5	17	142	0,1881	0,8119	2,068	0,4652
6	10	95	0,2769	0,7231	1,635	0,513
7	17	79	0,137	0,863	2,364	0,6253
8	16	151	0,1691	0,8309	2,163	0,5435
9	13	117	0,198	0,802	1,912	0,5206
10	16	69	0,1296	0,8704	2,323	0,6381
11	19	261	0,2009	0,7991	2,046	0,4071
12	17	116	0,2488	0,7512	1,9	0,3932
13	14	113	0,1434	0,8566	2,144	0,6097
14	18	230	0,1705	0,8295	2,213	0,5081
15	22	738	0,5599	0,4401	1,126	0,1401
16	17	86	0,1309	0,8691	2,339	0,61
17	12	65	0,1517	0,8483	2,11	0,6872

18	17	161	0,127	0,873	2,317	0,5969
----	----	-----	-------	-------	-------	--------

Tabla 8.31: Número de apariciones (NA), frecuencia de aparición (FA) y abundancia relativa (AR) de los diferentes taxones identificados en la cámara anóxica.

Taxón	NA (Ud.)	FA (%)	AR (%)
<i>Bodo saltans</i>	18	100,00	5,20
<i>Entosiphon sp</i>	4	22,22	0,73
<i>Euglena sp</i>	1	5,56	0,04
<i>Notosolenus sp</i>	2	11,11	0,07
<i>Peranema sp</i>	10	55,56	1,38
<i>Petalomonas sp</i>	2	11,11	0,07
Amebas desnudas < 20 micras	7	38,89	0,84
Amebas desnudas 20-50 micras	12	66,67	1,56
Amebas desnudas > 50 micras	2	11,11	0,15
<i>Arcella sp</i>	14	77,78	9,20
<i>Centropyxis sp</i>	1	5,56	0,04
<i>Euglypha sp</i>	16	88,89	7,67
<i>Trinema sp</i>	5	27,78	1,35
<i>Dexiotrichia sp</i>	1	5,56	0,07
<i>Plagiocampa sp</i>	6	33,33	1,02
<i>Plagiopyla sp</i>	4	22,22	0,36
<i>Prorodon sp</i>	2	11,11	0,22
<i>Uronema sp</i>	1	5,56	0,07
<i>Acinertia uncinata</i>	14	77,78	10,95
<i>Aspidisca cicada</i>	16	88,89	8,36
<i>Aspidisca lynceus</i>	7	38,89	2,55
<i>Chilodonella sp</i>	2	11,11	0,07
<i>Pseudochilodonopsis sp</i>	3	16,67	0,29
<i>Trochilia minuta sp</i>	12	66,67	28,29
<i>Epistylis spp</i>	10	55,56	8,87
<i>Metacystis sp</i>	1	5,56	0,04
<i>Opercularia sp</i>	4	22,22	0,33
<i>Stentor sp</i>	3	16,67	0,15
<i>Thuricola sp</i>	6	33,33	1,42
<i>Vaginicola sp</i>	4	22,22	0,80
<i>Vorticella campanula</i>	1	5,56	0,07
complejo <i>Vorticella convallaria</i>	14	77,78	2,11
complejo <i>Vorticella microstomun</i>	3	16,67	0,91
<i>Vorticella sp</i>	4	22,22	0,15
<i>Vorticella spp</i>	8	44,44	0,76
<i>Vorticella striata</i>	5	27,78	1,16
<i>Zoothamnium sp</i>	1	5,56	0,11
<i>Acineta sp</i>	3	16,67	0,11
<i>Tokophrya sp</i>	6	33,33	0,51
Acaro	1	5,56	0,04
Rotíferos	14	77,78	1,38
Nemátodo	4	22,22	0,25
Otros 3	2	11,11	0,11
Otros 4	1	5,56	0,11
Otros 10	1	5,56	0,07

Tabla 8.32: Número de apariciones (NA), frecuencia de aparición (FA) y abundancia relativa (AR) de los diferentes taxones identificados en la cámara aeróbica.

Taxón	NA (Ud.)	FA (%)	AR (%)
<i>Bodo saltans</i>	18	100,00	5,13
<i>Entosiphon sp</i>	3	16,67	1,16
<i>Euglena sp</i>	3	16,67	0,15
<i>Notosolenus sp</i>	2	11,11	0,15
<i>Peranema sp</i>	13	72,22	1,50
<i>Petalomonas sp</i>	1	5,56	0,04
Ameba radiosa	1	5,56	0,04
Amebas desnudas < 20 micras	7	38,89	0,46
Amebas desnudas 20-50 micras	10	55,56	0,96
<i>Arcella sp</i>	14	77,78	10,02
<i>Centropyxis sp</i>	3	16,67	0,15
<i>Euglypha sp</i>	13	72,22	6,36
<i>Trinema sp</i>	7	38,89	1,66
<i>Holophrya sp</i>	1	5,56	0,04
<i>Plagiocampa sp</i>	9	50,00	1,66
<i>Plagiopyla sp</i>	4	22,22	0,42
<i>Prorodon sp</i>	1	5,56	0,12
<i>Acinera uncinata</i>	16	88,89	14,76
<i>Aspidisca cicada</i>	14	77,78	12,06
<i>Aspidisca lynceus</i>	8	44,44	3,51
<i>Chilodonella sp</i>	3	16,67	0,42
<i>Euplotes sp</i>	1	5,56	0,04
<i>Litonotus sp</i>	1	5,56	0,04
<i>Pseudochilodonopsis sp</i>	1	5,56	0,04
<i>Trochilia minuta sp</i>	10	55,56	22,77
<i>Epistylis spp</i>	8	44,44	4,78
<i>Opercularia sp</i>	3	16,67	0,89
<i>Stentor sp</i>	3	16,67	0,15
<i>Thuricola sp</i>	4	22,22	1,08
<i>Vaginicola sp</i>	4	22,22	1,08
complejo <i>Vorticella aquadulcis</i>	1	5,56	0,08
complejo <i>Vorticella convallaria</i>	12	66,67	2,04
<i>Vorticella sp</i>	2	11,11	0,27
<i>Vorticella spp</i>	7	38,89	1,12
<i>Vorticella striata</i>	5	27,78	1,31
<i>Zoothamnium sp</i>	1	5,56	0,12
<i>Acineta sp</i>	2	11,11	0,08
<i>Tokophrya sp</i>	5	27,78	0,31
Rotíferos	13	72,22	2,24
Gastrotrico	0	0,00	0,00
Nemátodo	6	33,33	0,23
Otros 6	2	11,11	0,35
Otros 7	5	27,78	0,19
Otros 10	1	5,56	0,04

Tabla 8.33: Número de apariciones (NA), frecuencia de aparición (FA) y abundancia relativa (AR) de los diferentes taxones identificados en el reactor MBR.

Taxón	NA (Ud.)	FA (%)	AR (%)
<i>Bodo saltans</i>	18	100,00	6,13
<i>Astasia sp</i>	1	5,56	0,04
<i>Distigma sp</i>	1	5,56	0,08
<i>Entosiphon sp</i>	7	38,89	0,62
<i>Euglena sp</i>	2	11,11	0,08
<i>Notosolenus sp</i>	1	5,56	0,04
<i>Peranema sp</i>	12	66,67	1,93
<i>Rhabdomonas sp</i>	1	5,56	0,04
Ameba radiosa	1	5,56	0,04
Amebas desnudas < 20 micras	4	22,22	0,54
Amebas desnudas 20-50 micras	9	50,00	1,12
Amebas desnudas > 50 micras	2	11,11	0,08
<i>Arcella sp</i>	14	77,78	6,78
<i>Centropyxis sp</i>	1	5,56	0,08
<i>Euglypha sp</i>	16	88,89	6,13
<i>Trinema sp</i>	6	33,33	0,85
<i>Plagiocampa sp</i>	10	55,56	2,70
<i>Plagiopyla sp</i>	5	27,78	0,50
<i>Spirostomun sp</i>	1	5,56	0,08
<i>Acinertia uncinata</i>	14	77,78	11,37
<i>Aspidisca cicada</i>	16	88,89	13,37
<i>Aspidisca lynceus</i>	9	50,00	4,78
<i>Chilodonella sp</i>	1	5,56	0,04
<i>Euplotes sp</i>	1	5,56	0,04
<i>Pseudochilodonopsis sp</i>	2	11,11	0,39
<i>Trochilia minuta sp</i>	9	50,00	25,24
<i>Epistylis spp</i>	12	66,67	7,28
<i>Epistylis sp</i>	1	5,56	1,77
<i>Opercularia sp</i>	4	22,22	1,85
<i>Stentor sp</i>	2	11,11	0,08
<i>Thuricola sp</i>	7	38,89	1,16
<i>Vaginicola sp</i>	7	38,89	2,54
complejo <i>Vorticella aquadulcis</i>	1	5,56	0,04
complejo <i>Vorticella convallaria</i>	15	83,33	6,74
complejo <i>Vorticella microstomun</i>	1	5,56	0,23
<i>Vorticella sp</i>	4	22,22	0,27
<i>Vorticella spp</i>	9	50,00	2,16
<i>Vorticella striata</i>	4	22,22	1,46
<i>Zoothamnium sp</i>	1	5,56	0,19
<i>Acineta sp</i>	3	16,67	0,12
<i>Tokophrya sp</i>	8	44,44	0,69
Rotíferos	14	77,78	2,08
Gastrotrico	1	5,56	0,04
Nemátodo	7	38,89	0,54
Otros 1	4	22,22	0,54
Otros 4	1	5,56	0,04
Otros 5	2	11,11	0,85
Otros 8	1	5,56	0,04
Otros 9	1	5,56	0,04
Otros 10	1	5,56	0,04

Tabla 8.34: Media y desviación estándar (DE) por muestra y global de la proporción de bacterias amonio oxidantes (AOB) y bacterias nitrito oxidantes (NOB) respecto de las bacterias viables totales (VT), en los reactores: A: Reactor anóxico; B: Reactor aeróbico.

A	MEDIA AOB	DE AOB	MEDIA NOB	DE NOB	MEDIA VT	DE VT
AVM 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
AVM 2	9,91	5,11	6,64	3,26	69,30	59,25
AVM 3	7,42	1,95	9,00	3,80	106,94	24,27
AVM 4	4,94	1,49	5,70	1,43	115,78	11,32
AVM 5	7,63	2,32	8,79	1,91	97,64	18,36
AVM 6	11,96	5,81	15,00	6,17	112,75	13,55
AVM 7	12,55	6,53	12,83	4,44	101,35	22,00
AVM 8	15,65	13,33	19,51	13,15	128,23	29,31
AVM 9	12,13	7,20	18,72	17,96	122,75	15,11
AVM 10	39,72	37,84	32,22	29,83	131,99	16,73
AVM 11	22,54	13,59	16,97	10,33	197,72	11,78
AVM 12	13,51	4,72	13,07	5,61	157,15	19,29
AVM 13	13,45	4,80	11,36	4,75	133,62	51,04
AVM 14	4,25	5,81	2,97	2,07	133,13	8,08
AVM 15	6,12	3,01	4,24	1,74	136,63	46,72
AVM 16	19,29	6,87	12,24	6,83	129,45	18,81
AVM 17	10,56	7,10	7,57	3,40	178,52	7,66
AVM 18	4,59	2,22	4,58	2,68	194,09	7,56
MEDIA	12,01	8,88	11,19	7,60	124,84	16,04

B	MEDIA AOB	DE AOB	MEDIA NOB	DE NOB	MEDIA VT	DE VT
AVM 1	17,94	11,07	14,83	8,27	158,25	35,09
AVM 2	9,78	4,60	8,02	3,53	45,87	23,55
AVM 3	7,92	4,26	6,94	2,96	149,34	20,46
AVM 4	5,83	2,18	4,72	1,67	93,65	27,02
AVM 5	8,03	4,62	9,41	5,44	107,66	15,31
AVM 6	9,61	4,47	11,02	5,41	97,96	10,53
AVM 7	11,72	3,35	11,26	3,63	129,70	2,35
AVM 8	36,45	17,86	29,44	12,35	123,26	12,40
AVM 9	8,92	3,96	9,08	4,91	131,35	11,47
AVM 10	11,83	4,69	10,16	5,04	192,09	7,04
AVM 11	17,41	7,36	20,43	12,46	153,46	52,93
AVM 12	17,61	9,64	15,15	5,82	202,34	13,56
AVM 13	3,00	2,00	4,00	2,00	7,50	0,71
AVM 14	5,74	2,44	4,05	2,13	132,65	26,69
AVM 15	6,07	2,86	4,43	2,12	109,11	30,40
AVM 16	13,24	8,69	9,05	7,50	161,01	22,05
AVM 17	10,46	7,77	7,64	5,14	129,44	17,51
AVM 18	7,62	4,29	5,54	3,30	175,57	9,77
MEDIA	11,62	7,52	10,29	6,46	127,79	12,72

Tabla 8.35: Concentración, intervalo de confianza (IC), media y desviación estándar (DE) obtenido para las diferentes dianas analizadas mediante PCR digital.

Diana	Concentración (copias/ μ L)	IC (95%)	Media	DE
gen <i>amoA</i> de AOA	1,8	0,331	1,45	0,49
	1,1	0,427		
gen <i>amoA</i> de AOB en filo <i>Betaproteobacteria</i>	6894,8	0,006	6831,35	89,73
	6767,9	0,006		
gen <i>amoA</i> de <i>Nitrospira comammox</i> (CA209F)	2607	0,014	2705,90	139,87
	2804,8	0,013		
<i>Nitrospira amoA</i> clado A	5448,8	0,006	5668,40	310,56
	5888	0,006		
gen <i>amoA</i> de <i>Nitrospira comammox</i> clado B	737,9	0,017	580,30	222,88
	422,7	0,022		
gen <i>cynS</i> de sNOB	8002,2	0,005	8213,20	298,40
	8424,2	0,006		
gen <i>amoA</i> de <i>Nitrospira comammox</i> (A189Y)	5159,7	0,007	5162,40	3,82
	5165,1	0,007		
gen <i>NxrB</i> de <i>Nitrospira</i>	6818,2	0,005	7065,80	350,16
	7313,4	0,005		
gen <i>ARNr 16s</i> de <i>Bacteria</i> región V3-V4	8296,1	0,005	8414,40	167,30
	8532,7	0,005		

Tabla 8.36: Identificación de las cepas procedentes del licor mezcla de la EDAR Arroyo Valenoso y su código correspondiente en la base de datos del NCBI. El asterisco (*) indica que es una cepa sin identificar.

CEPA	IDENTIFICACIÓN COMPLETA	Entrada
1	<i>Aeromonas veronii</i>	KC923288.1
2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KF720725.1
3	<i>Enterobacter mori</i>	MG846019.1
4	<i>Pseudomonas sp.</i>	
5	<i>Pseudomonas sp.</i>	
6	no cultivable/desconocida	
7	*	*
8	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KF720732.1
9	<i>Pseudomonas sp.</i>	KY979145.1
10	*	*
11	<i>Acinetobacter bohemicus</i>	MG576040.1
12	<i>Aeromonas rivipollensis</i>	NR_144574.1
13	<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>	
14	<i>Enterobacter cloacae</i>	MG871227.1
15	<i>Acinetobacter/no cultivable</i>	GU641333.1
16	<i>Enterobacter mori/cloacae</i>	
17	*	*
18	<i>Pseudomonas aeruginosa/no cultivada</i>	FN995188.1
19	<i>Pseudomonas sp./Pseudomonas putida</i>	MF838701.1
20	<i>Acinetobacter</i>	MK796536.1
21	<i>Bacillus velezensis</i>	CP026533.1
22	no cultivada/ <i>Microbacterium</i>	GQ009760.1
23	<i>Escherichia coli/ Enterobacter cloacae</i>	*
24	<i>Aeromonas rivipollensis</i>	KY928090.1
25	<i>Pseudomonas alcaligenes/jinjuensis</i>	KT998857.1/KF720714.1
26	no cultivado/ <i>Bifidobacterium stellenboschense</i>	HQ814867.1/MG654785.1
26 bis	no cultivada/ <i>Pseudomonas sp.</i>	MG456885.1
27	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	MF627712.1
28	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	EU109736.1
29	<i>Bacillus sp. (cereus/thuringiensis)</i>	HE805963.1
30	<i>Bacillus cereus</i>	KU897074.1

31	<i>no cultivada/Pseudomonas sp.</i>	EU537986.1
32	<i>no cultivada/Acinetobacter</i>	GU643218.1/KC605644.1
33	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KU897088.1
34	<i>Ruminococcus productus</i>	AY269233.1
35	<i>no cultivada</i>	GU783257.1
36	<i>no cultivada/Acinetobacter</i>	KF008711.1
37	<i>Bacillus cereus</i>	CP026678.1
38	<i>Bacillus thuringiensis</i>	NR_112780.1
39	<i>Pseudomonas jinjuensis/no cultivada</i>	KF720714.1/AY537708.1
40	<i>no cultivada/Acinetobacter</i>	DQ788533.1
41	<i>Pseudomonas fulva</i>	CP014025.1
42	<i>Enterobacter mori/ludwigii</i>	MH101421.1/MH085465.1
43	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CP037926.1
44	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	EU109736.1
45	<i>Bacillus thuringiensis</i>	KF971833.1
46	<i>Bacillus thuringiensis</i>	MH194185.1
47	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	MH178359.1
48	<i>Aeromonas media</i>	FJ464587.1
49	<i>Acinetobacter baumannii</i>	CP027123.1
50	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CP036438.1
51	<i>Pseudomonas jinjuensis</i>	KF720714.1
52	<i>No cultivada, Klebsiella pneumoniae</i>	EF515220.1; CP036438.1
53	*	*
54	<i>Bacillus cereus</i>	MK704287.1
55	<i>Bacillus sp.</i>	KF966341.1
56	<i>Fictibacillus phosphorivorans</i>	MG263748.1
57	<i>Acinetobacter sp./no cultivada</i>	MH179328.1
58	<i>Acinetobacter bouvetii</i>	AB859676.1
59	<i>Aeromonas enteropelogenes</i>	MK649835.1
60	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KF720725.1
61	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KU897088.1
62	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	LC339930.1/MH158560.1/ MH675504.1
63	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KY670736.1/CP024477.1
64	<i>Bacillus sp./cereus</i>	MH141435.1
65	<i>Bacillus cereus</i>	JF935090.1
66	<i>Bacillus sp.</i>	MH235735.1
67	<i>Vitreoscilla sp./stercoraria</i>	CP019644.1/NR_025894.1
68	<i>Acinetobacter sp./lwoffii</i>	GU290325.1/LT899953.1
69	<i>Enterobacter sp/Enterobacter ludwigii</i>	MK643313.1/MF666750.1
70	<i>Pseudomonas sp</i>	MH931535.1
71	<i>Acinetobacter baumannii</i>	CP027123.1
72	<i>Pseudomonas putida/sp</i>	MG836140.1; MK685233.1
73	<i>Pseudomonas sp</i>	KC936278.1
74	<i>Bacillus sp./thuringiensis</i>	MH173914.1/MH173903.1
75	<i>Acinetobacter johnsonii/no cultivada</i>	MG846022.1
76	<i>Pseudomonas/no cultivada</i>	MG818309.1
77	<i>Pseudomonas sp/plecogossicida</i>	KM374717.1
78	*	*
79	<i>Pseudomonas plecogossicida</i>	KM374717.1
80	<i>Pseudomonas sp/plecogossicida</i>	KY979145.1
81	<i>Bacillus anthracis</i>	KJ187479.1
82	<i>Bacillus thuringiensis</i>	MG890229.1
83	<i>Bacillus cereus/no cultivada</i>	JF963965.1
84	<i>Aeromonas hydrophila</i>	AY880184.1
85	<i>no cultivada/Aeromonas sp.</i>	KP050756.1/KC339712.1
86	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	CP022058.2
87	<i>Raoultella ornithinolytica/Klebsiella aerogenes/sp</i>	KT767970.1/CP026756.1/GU290324.1
88	<i>Klebsiella oxytoca</i>	CP017928.1

89	<i>Pseudomonas sp/ Pseudomonas no cultivada</i>	AY738644.1/KT893464.1
90	<i>Pseudomonas sp.</i>	CP024478.1
91	<i>Bacillus cereus</i>	CP026678.1
92	<i>Bacillus cereus</i>	MG650865.1
93	<i>no cultivado, Bacillus o Halobacillus</i>	KC449852.1/GU368040.1/GQ903460.1
94	<i>Bacillus idriensis/sp</i>	KU862325.1; KP992139.1/MK484314.1
95	<i>Acinetobacter bohemicus</i>	MG576040.1/MK402065.1
96	<i>cepa perdida, no creció</i>	*
97	<i>varias posibles especies</i>	*
98	<i>Aeromonadacea no cultivada</i>	LT688646.1
99	*	*
100	<i>Pseudomonas plecogossicida</i>	KM374717.1
101	<i>Pseudomonas plecogossicida</i>	KM374717.1
102	<i>Bacillus cereus</i>	CP026678.1
103	<i>bacilo no clasificado/Bacillus</i>	FM173702.1/JQ266283.1
104	<i>Bacillus sp./cereus</i>	AF406633.1
105	<i>Bacillus flexus</i>	MG407663.1
106	<i>Bacillus sp./toyonensis</i>	HE805963.1/MH211321.1
107	<i>Bacillus sp./toyonensis</i>	HE805963.1/MH211321.1
108	*	*
109	<i>Psychrobacillus psychrodurans</i>	MK737179.1/KP334978.1
110	<i>Bacillus cereus</i>	MH985237.1
111	<i>Acinetobacter baumannii</i>	CP034427.1
112	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	MG846022.1
113	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	MK818764.1
114	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	HQ434553.1

Tabla 8.36: Valores de absorbancia obtenida a partir del ensayo del cristal violeta realizado a las cepas bacterianas aisladas de la membrana del reactor MBR.

Cepas bacterianas procedentes de la membrana												
Placa 1												
Fila	Blanco 1	Blanco 2	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5	Cepa 6	Cepa 7	Cepa 9	Cepa 10	Cepa 11	Cepa 12
A	0,061	0,050	0,129	0,096	0,058	0,069	1,211	0,107	0,584	0,192	0,174	0,397
B	0,051	0,062	0,104	0,109	0,075	0,083	1,479	0,102	0,649	0,193	0,275	0,459
C	0,037	0,054	0,106	0,098	0,051	0,088	1,499	0,124	0,647	0,377	0,259	0,521
D	0,056	0,120	0,092	0,106	0,057	0,077	1,494	0,150	0,467	0,215	0,310	1,224
E	0,060	0,075	0,101	0,120	0,055	0,078	1,445	0,107	0,659	0,322	0,400	1,295
F	0,053	0,058	0,103	0,100	0,080	0,071	1,476	0,185	0,664	0,206	0,429	1,259
G	0,055	0,055	0,108	0,099	0,055	0,070	1,442	0,107	0,665	0,303	0,440	0,658
H	0,054	0,054	0,127	0,109	0,060	0,057	1,266	0,107	0,608	0,302	0,364	0,508
Placa 2												
Fila	Blanco 1	Blanco 2	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5	Cepa 6	Cepa 7	Cepa 9	Cepa 10	Cepa 11	Cepa 12
A	0,058	0,050	0,141	0,089	0,058	0,060	1,282	0,079	0,635	0,109	0,175	0,464
B	0,053	0,051	0,142	0,093	0,055	0,066	1,405	0,087	0,664	0,141	0,118	0,453
C	0,054	0,050	0,144	0,098	0,050	0,060	1,454	0,106	0,685	0,118	0,061	0,442
D	0,052	0,050	0,178	0,086	0,062	0,074	1,581	0,090	0,716	0,101	0,095	0,417
E	0,054	0,053	0,166	0,090	0,055	0,079	1,313	0,097	0,753	0,135	0,133	0,434
F	0,052	0,053	0,151	0,094	0,051	0,069	1,340	0,094	0,681	0,146	0,162	0,440
G	0,054	0,052	0,195	0,087	0,053	0,070	1,192	0,095	0,650	0,095	0,144	0,440
H	0,053	0,153	0,144	0,084	0,049	0,069	1,277	0,098	0,614	0,139	0,174	0,422

