



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

Universidad Nacional Autónoma de México



**“EFECTO DE LA CARGA EN LA COMPOSICIÓN
MICROBIANA DEL LODO ACTIVADO CON
ALTO TIEMPO DE RETENCIÓN”**

T E S I S

que para obtener el grado académico de

**Maestro en Ciencias
(Limnología)**

p r e s e n t a

FERNANDO BAUTISTA REYES

Director de Tesis: Dr. MIROSLAV MACEK

Comité Tutorial: Dr. MARTÍN MERINO IBARRA

Dra. PATRICIA BONILLA LEMUS

Dra. ELVA G. ESCOBAR BRIONES

Dr. SIMÓN GONZÁLEZ MARTÍNEZ

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mi Familia y a mi hermano Alfredo†

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera especial al Dr. Miroslav Macek por haberme permitido trabajar bajo su dirección y por haberme transmitido parte de sus conocimientos durante el desarrollo de este trabajo.

Agradezco profundamente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada con número de registro 190202 para la realización de los estudios de maestría. Asimismo a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM que a través de los Programas de Apoyo para la Innovación e Investigación Tecnológica (PAPIIT) otorgó una beca del periodo agosto 2006 – diciembre 2006 por medio del proyecto PAPIIT-IN207206.

Agradezco igualmente el apoyo recibido a través de los proyectos UNAM-PAPIIT IN-207702 y SEMARNAT – CONACYT COI-1125, bajo la responsabilidad del Dr. Martín Merino Ibarra.

Mi agradecimiento al personal de la empresa Cognis Mexicana-Henkel particularmente a Juan M. Álvarez por las facilidades otorgadas para el desarrollo de este trabajo y afectuosamente al Biol. Juan Cortés por el apoyo otorgado durante la realización del estudio así como los datos proporcionados a lo largo del mismo.

Al Ing. Adolfo Ángeles Domínguez y al Sr. José Artigas de la empresa ACTIF S.A. de C.V. deseo agradecer la información requerida y facilidades otorgadas para el desarrollo de este estudio.

Agradezco al Laboratorio de Biogeoquímica Acuática del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología por el apoyo otorgado en la realización de los análisis de las muestras.

A la Dra. Patricia Bonilla Lemus deseo agradecer los comentarios y correcciones en la realización del manuscrito de tesis durante la elaboración de este trabajo.

A la Dra. Elva G. Escobar Briones deseo agradecer profundamente las correcciones y comentarios realizados al presente trabajo.

Quiero agradecer al Dr. Martín Merino Ibarra las observaciones realizadas durante la elaboración de este trabajo y en la redacción del manuscrito.

Expreso mi gratitud al Dr. Simón González Martínez por los comentarios y observaciones en la elaboración y desarrollo de este trabajo.

Agradezco a la M. en C. María Elena Martínez Pérez por la ayuda otorgada en el análisis de DBO_5 de las muestras de la planta de tratamiento del Club Náutico Avándaro.

También deseo agradecer al Hidrobiólogo Fermín Sergio Castillo Sandoval y al M. en C. Jorge Ramírez por su colaboración en el análisis de las muestras de nutrimentos usadas en este estudio y las observaciones realizadas al respecto de los mismos.

A todas las personas del Club Náutico Avándaro deseo agradecer las facilidades otorgadas para el desarrollo de este trabajo, particularmente a Daniel Coranguez deseo agradecer el apoyo concedido durante la realización de este trabajo así como la información brindada.

Mi más sincero agradecimiento a Sandrita por su ayuda y apoyo.

ÍNDICE

Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
2. Antecedentes.....	5
3. Sistemas estudiados.....	10
3.1 <i>Generalidades</i>	10
3.2 <i>Planta de tratamiento Cognis-Henkel</i>	12
3.3 <i>Planta de tratamiento en el Club Náutico Avándaro</i>	15
4. Objetivos.....	17
5. Metodología.....	18
5.1 <i>Programación de los muestreos</i>	18
5.2 <i>Muestras de biomasa</i>	18
5.3 <i>Muestras para análisis de DBO₅, nitrógeno y fósforo</i>	19
5.4 <i>Análisis de biomasa</i>	19
5.5 <i>Análisis de la comunidad microbiana</i>	19
5.6 <i>Estimación de la carga orgánica en los sistemas</i>	23
5.7 <i>Análisis de DBO₅, nitrógeno y fósforo</i>	23
5.8 <i>Evaluación de resultados</i>	24
6. Resultados.....	25
6.1 <i>Planta de tratamiento Cognis-Henkel</i>	25
6.2 <i>Planta de tratamiento Club Náutico Avándaro</i>	30

7. Discusión.....	37
7.1 <i>Planta de tratamiento Cognis-Henkel</i>.....	37
7.2 <i>Planta de tratamiento Club Náutico Avándaro</i>.....	47
8. Conclusiones.....	51
9. Referencias.....	52
Anexo 1.....	59
Anexo 2.....	60

Abreviaturas Utilizadas

Símbolo	Unidades	Definición
μ_{\max}	d^{-1}	($Y q^{\wedge}$) Tasa específica máxima de crecimiento
ARCH	%	Porcentaje de células de Archaea relativo a C_H
BET	%	Porcentaje de células de Betaproteobacteria relativo a C_H
B_x	$kg\ DBO_5\ kg\ SSLM^{-1}\ d^{-1}$	Carga orgánica
CF	%	Porcentaje de células de Bacteroidetes relativo a C_H
C_H	células mL^{-1}	Número total de células hibridadas
C_T	células mL^{-1}	Número de células totales
G+	%	Porcentaje de células Gram positivas relativo a C_H
GAM	%	Porcentaje de células de Gammaproteobacteria relativo a C_H
PAR	%	Porcentaje de células de <i>Paracoccus</i> relativo a C_H
PLA	%	Porcentaje de células de Planctomycetes relativo a C_H
Q	$m^3\ d^{-1}$	Flujo de alimentación
q^{\wedge}	$g\ DBO\ g\ SSV^{-1}\ d^{-1}$	Tasa específica máxima de utilización de sustrato
SRB	%	Porcentaje de células de Deltaproteobacteria relativo a C_H
SSLM	$mg\ L^{-1}$	Concentración de sólidos suspendidos totales en el tanque de aireación
SSV		Sólidos suspendidos volátiles
V	m^3	Volumen del tanque de aireación
Y	$g\ SSV\ g\ DBO^{-1}$	Coefficiente de eficiencia de crecimiento
θ	d^{-1}	(V/Q) Tiempo de retención hidráulica
θ_x	d^{-1}	($X V / (Q^e X^e + Q^w X^w)$) Tiempo de retención de los sólidos (edad de lodos) donde: V es el volumen del sistema, Q^e es el flujo del efluente, Q^w es el flujo de lodos de desecho y X , X^e y X^w son las concentraciones de sólidos en el tanque de aireación, el efluente y en lodos de desecho respectivamente en unidades de masa consistentes.

RESUMEN

Se ha propuesto que los cambios periódicos en la carga orgánica de los sistemas de tratamiento, conducen a cambios transitorios en la tasa específica de crecimiento de los organismos y por tanto, a cambios transitorios en la estructura de la comunidad microbiana. Lo anterior se refleja como un incremento en los niveles de ARNr (ácido ribonucleico ribosomal) en los microorganismos capaces de responder a los cambios transitorios en la carga orgánica, mientras que aquellos organismos que no responden a los cambios mantienen iguales sus niveles de ARNr. La hipótesis se estudió en el lodo activado de dos plantas de tratamiento, una planta que trata aguas de tipo industrial, que utiliza membranas para la separación del lodo activado y que funciona como un sistema SBR, y otra planta que trata aguas residuales de tipo doméstico con carga orgánica en el intervalo para sistemas de aireación extendida, la cual sólo recibe agua residual en fines de semana. Se tomaron y analizaron muestras de biomasa antes y después del ingreso de agua residual a los sistemas. De acuerdo al método FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) las proporciones de los grupos estudiados cambiaron entre una y otra muestra, también se observaron cambios a lo largo del periodo de estudio. Las comunidades de las dos plantas de tratamiento estuvieron dominadas por organismos pertenecientes a Betaproteobacteria y Bacteroidetes, de acuerdo a lo observado mediante la técnica FISH. Se utilizó un análisis de regresión múltiple con la finalidad de identificar las posibles variables involucradas en el comportamiento de la comunidad microbiana. A pesar de que se observó que la comunidad microbiana en ambas plantas de tratamiento fue muy dinámica, no se encontró correlación entre las variaciones estimadas en la carga orgánica y los cambios de la comunidad microbiana. La estructura de la comunidad microbiana evidentemente depende de muchos otros factores incluyendo las interacciones entre los microorganismos del lodo activado, lo cual no permite simplificar la relación entre parámetros fisicoquímicos y la dinámica de la comunidad.

Palabras clave: Lodo activado, bacterias, FISH, dinámica microbiana, carga orgánica.

1. INTRODUCCIÓN

En los ambientes acuáticos los microorganismos crecen y viven preferiblemente en forma de agregados en los cuales especies mezcladas existen en proximidad. Se estima que más del 99% de todos los microorganismos de la Tierra viven en agregados tales como “biopelículas” y “flóculos” (Wingender y Flemming, 1999) los cuales proveen redes tridimensionales que mantienen juntas a las células, permitiendo la evolución estable de las asociaciones y creando un ambiente donde las células microbianas están protegidas de condiciones ambientales adversas.

Las biopelículas se desarrollan en interfases, adheridas a una superficie sólida (sustrato) en la interfase sólido-agua y también en la interfase agua-aire, donde las sustancias hidrofóbicas y los microorganismos se acumulan. Los agregados o flóculos son acumulaciones de microorganismos (procariotas y organismos eucariotas unicelulares), sustancias poliméricas extracelulares, cationes multivalentes, partículas biogénicas e inorgánicas, así como compuestos coloidales y disueltos (Wingender y Flemming, 1999; Nielsen *et al.*, 2004).

Un aspecto en común de los agregados de microorganismos es que permiten que se establezca una asociación de diferentes especies, la cual es capaz de degradar simultáneamente sustratos complejos que de otra forma serían inaccesibles a una sola cepa. De igual forma pueden evolucionar niveles tróficos complejos que involucran a protistas y metazoos, cuya existencia está basada en el consumo de la biomasa acumulada en forma de microorganismos, razón por la que se puede considerar a los sistemas biológicos de tratamiento de agua residual como sistemas acuáticos especializados.

El agua que ha sido usada por el hombre y dispuesta dentro de un cuerpo receptor donde los parámetros físicos y químicos están alterados es por definición agua residual. Si el agua usada ha sido contaminada con material soluble o insoluble, ya sea orgánico o inorgánico, debe ser tratada mediante una combinación de procedimientos de purificación mecánicos, biológicos y/o químicos para proteger al ambiente de contaminación y daño temporal o permanente.

El tratamiento del agua residual tiene varias etapas con una función bien determinada, entre las que se distinguen: a) tratamiento previo, cuyo objetivo es retirar del influente las partículas sólidas de mayor tamaño; b) tratamiento primario, en la que se separa el resto de los materiales sedimentables y flotantes que se encuentran en el influente; c) tratamiento secundario, para eliminar la materia orgánica disuelta y coloidal biodegradable presente; d) tratamiento terciario, para eliminar una serie de compuestos como son las sustancias nitrogenadas, los compuestos fosforados y distintos tipos de materia orgánica e inorgánica disueltos y e) tratamiento de desinfección, el cual persigue la eliminación de microorganismos que pudieran resultar infecciosos. La aplicación de estos procedimientos depende de las características del influente (Seoanez, 1995).

En el proceso de tratamiento de las aguas residuales el uso de microorganismos en el tratamiento secundario se conoce como tratamiento biológico, en el que se pretende seleccionar a la comunidad microbiana mixta (de aquí en adelante el término comunidad microbiana se utiliza para referirse únicamente a los organismos procariotas presentes en los lodos activados) más efectiva en la forma de flóculos y/o biopelículas. El proceso de lodos activados es posiblemente el proceso biológico más utilizado en el tratamiento del agua residual, y depende de un alto número de microorganismos presentes en los flóculos, los cuales se mantienen suspendidos por medio de aireación. De acuerdo con Nielsen

et al. (2004), típicamente el 80% de los microorganismos son activos o bien vivos de acuerdo a estimaciones realizadas por diferentes métodos.

La eficiencia del tratamiento depende de la eliminación de los sustratos disueltos y de la separación de la biomasa del agua ya tratada, la tasa de eliminación está relacionada con la tasa de crecimiento de los organismos. Es necesario mencionar que la producción neta de las bacterias se encuentra afectada por la depredación de ciliados y flagelados y que la depredación por parte de estos organismos favorece la floculación de las bacterias, lo que en última instancia afecta el tiempo promedio de retención celular en los sistemas de lodos activados, siendo esto último determinante en el crecimiento poblacional de las bacterias (Curds, 1973).

Además de lo mencionado anteriormente, debe considerarse que en el tratamiento biológico el agua residual es un caldo nutritivo para los organismos y éstos trabajan mejor bajo condiciones constantes y estables, las bacterias necesitarían por lo tanto, un ambiente óptimo no sólo físico sino también químico así como nutrientes de composición conocida. Ninguno de esos requerimientos se da completamente en el agua residual, la cual es a cada momento, una interrogante con respecto a la cantidad de nutrimentos y aun en cuanto a la presencia de tóxicos o inhibidores, por ello el principal problema del tratamiento biológico de las aguas residuales se origina a partir de la calidad de su composición nutrimental. En la mayoría de los casos el sustrato utilizado como donador de electrones es limitante en la reproducción y el crecimiento de los organismos (Rittmann y McCarty, 2001), en el proceso de lodos activados la demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5), que es una aproximación de la cantidad de materia orgánica disponible, es considerada como limitante, lo cual ocurre principalmente para aguas de tipo doméstico.

La operación eficiente de los procesos de lodos activados puede ser controlada monitoreando diferentes factores en los sistemas de tratamiento por ejemplo, características del influente como DQO (demanda química de oxígeno) y flujo de alimentación (Q); la concentración de los sólidos suspendidos del licor mezclado (SSLM) en el reactor biológico y el tiempo de retención de los sólidos en el sistema (θ_x); el tiempo de retención hidráulica (θ); así como la concentración de la DBO_5 o DQO en el efluente, entre otros. En efecto la estimación de la carga orgánica ($kg\ DBO\ kg\ SSLM^{-1}\ d^{-1}$), conocida también como razón F/M (por sus siglas en Inglés, Food / Microorganism ratio), es uno de los factores usados en la modificación de las configuraciones de los sistemas lodos activados.

A pesar de la utilidad de los factores anteriormente descritos en la operación de los sistemas de tratamiento, éstos no son representativos de la actividad de la biomasa, actividad que debe medirse para entender mejor las condiciones reales en que se desarrollan los microorganismos responsables de la biodegradación, considerando la estimación de que un intervalo entre el 80 – 99% de las bacterias en el ambiente no son detectables por métodos convencionales de cultivo (Andreottola *et al.*, 2001a). Para poder lograr un mejor entendimiento de los procesos que ocurren en los sistemas de lodos activados es necesario evaluar el crecimiento microbiano, la actividad metabólica y la actividad de la comunidad (Ebie *et al.*, 2001) por lo que es necesario generar conocimiento acerca de la estructura y función de tales comunidades.

Las bacterias que llevan a cabo los procesos complejos que ocurren en el sistema de lodos activados son divididas en grupos funcionales como bacterias libres suspendidas, bacterias formadoras de flóculos, bacterias filamentosas, nitrificadores, desnitrificadores, reductores de sulfato y organismos acumuladores de

fósforo. El tamaño de las poblaciones es caracterizado la mayoría de las veces midiendo las tasas de consumo de sustratos o la acumulación de metabolitos, pero esas mediciones sólo reflejan de forma inadecuada el tamaño de la población en términos del número de microorganismos ya que se basan en tasas obtenidas de cultivos específicos, lo que no corresponde necesariamente a lo que sucede en sistemas complejos, el uso de técnicas moleculares puede ser útil para identificar y enumerar a algunos de los organismos (Nielsen y Nielsen, 2001).

La estructura de una comunidad microbiana está definida principalmente por dos parámetros: identidad y abundancia de sus miembros. Una definición más amplia de estructura incluiría también el arreglo espacial de las especies en relación a las otras. Por lo que es necesario enfocar la atención a la identificación, enumeración y distribución temporal y/o espacial (parámetros estructurales) así como a las actividades *in situ* (parámetro funcional) de los miembros de la comunidad. Aún más, desde un punto de vista ecológico la estabilidad o dinámica de estas comunidades microbianas son importantes tanto para la teoría como para la práctica (Wingender y Flemming, 1999).

2. ANTECEDENTES

Las plantas de tratamiento de aguas residuales que emplean sistemas biológicos son sistemas dinámicos, los cuales están la mayoría de las veces expuestos tanto a cambios en las condiciones ambientales, como variaciones en la DBO, y descargas tóxicas (Love y Bott, 2001). Se piensa que las comunidades microbianas divergen en su composición dependiendo del grado de perturbación al que se encuentran expuestas (Kaewpipat y Grady, 2001).

Por otra parte la exposición de los microorganismos a las perturbaciones puede ser importante por ejemplo, es sabido que los mecanismos de estrés microbiano juegan un papel significativo en la adaptación a corto tiempo a las perturbaciones ambientales, y que la activación de tales mecanismos mejora las oportunidades de las células para sobrevivir con un mínimo de daño, pero estos mecanismos pueden ser una causa del mal desempeño de los sistemas (Love y Bott, 2001).

El crecimiento de una población bacteriana se encuentra determinado por la relación entre la concentración de un sustrato limitante y la tasa de crecimiento específica, expresada en la ecuación de Monod (Ecuación 1), (establecida como tasa enzimática por Michaelis y Menten):

$$\mu = \mu_{\max} \times \frac{S}{K_s + S} \quad (1)$$

Donde: μ = Tasa específica de crecimiento
 μ_{\max} = Tasa específica máxima de crecimiento
 S = Concentración de sustrato
 K_s = Constante de media saturación

De la relación entre la concentración del sustrato y la tasa de crecimiento se establece una relación entre el crecimiento de las diferentes poblaciones de organismos. Diferentes poblaciones pueden tener diferentes requerimientos de sustrato para su crecimiento, alcanzando tasas de crecimiento máximo diferentes (Figura 1), se hace necesario considerar que diferentes especies de bacterias exhiben diferentes cinéticas *in situ*, afinidades diferentes al sustrato y sensibilidad a varios factores (por ejemplo: pH, temperatura y concentración del oxígeno disuelto).

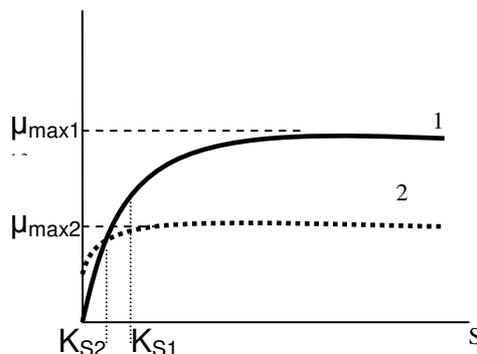


Figura 1 Relación entre la concentración del sustrato y la tasa de crecimiento para dos organismos con diferentes tasas de crecimiento

Por otra parte, el concepto de carga orgánica de lodo (B_x) es ampliamente usado debido a su simplicidad (Ecuación 2).

$$B_x = \frac{Q \times S_{DBO}^0}{V \times X} \quad (2)$$

Donde: B_x = carga orgánica (kg DBO kg SSLM⁻¹ d⁻¹)

Q = Flujo de alimentación (m³ d⁻¹)

S_{DBO}^0 = Concentración de la DBO₅ en el agua residual del influente (mg L⁻¹)

V = Volumen del tanque de aireación (m³)

X = Concentración de SSLM en el tanque de aireación (mg L⁻¹)

Sin embargo, tiene limitaciones debido a que la concentración de SSLM es una medición que sustituye a la biomasa de bacterias que se encuentran activas en el sistema, esto se debe a la dificultad existente al intentar medir el número de los organismos que son activos en la degradación de la DBO. Si fuera posible medir la biomasa de microorganismo activos en la degradación de la DBO podría establecerse una relación entre la carga orgánica (considerando sólo a los microorganismos activos) y la concentración de sustratos en el reactor (Rittmann y McCarty, 2001), que es igual a la concentración de sustratos en el efluente en un sistema completamente mezclado.

Debe considerarse que la parte activa de los microorganismos está compuesta por diferentes tipos de bacterias, algunas de las cuales pueden consumir diversos compuestos orgánicos, y otras más especializadas sólo consumen una pequeña fracción de las especies orgánicas presentes, lo que dificulta aun más el estudio de la fracción activa de la biomasa de los sistemas de tratamiento y su relación con la concentración de sustratos en el mismo.

A pesar de las dificultades inherentes al estudio de los microorganismos y su actividad en los sistemas de tratamiento, los modelos de lodos activados describen las cinéticas de biodegradación por medio de la clasificación de los sustratos en dos tipos: a) sustratos rápidamente degradables y b) sustratos lentamente degradables. Asumiendo que el cultivo mixto contiene poblaciones microbianas especializadas en la degradación de un determinado tipo de sustrato, sus tasas de crecimiento deberían estar afectadas diferencialmente si la carga orgánica del sistema varía en un periodo de tiempo. Los resultados de los modelos sugieren que las tasas de crecimiento de las poblaciones que consumen sustratos rápidamente degradables varían de acuerdo a las variaciones en la carga de lodo del sistema. Por otra parte las tasas de crecimiento de las poblaciones que consumen sustratos lentamente degradables no cambian a pesar de las variaciones en la carga orgánica del sistema (Frigon *et al.*, 2001).

La dificultad con respecto a la medición de la biomasa activa en los sistemas de tratamiento, no excluye la posibilidad de que las respuestas de los organismos a las variaciones en la carga orgánica sean estudiadas, la sugerencia de que los niveles de ácido ribonucléico ribosomal (ARNr) en las células se encuentran positivamente correlacionados con la tasa de crecimiento (Frigon *et al.*, 2001), permite establecer el planteamiento de que la fluctuación en la carga orgánica tiene un impacto en la actividad metabólica, que se refleja en el contenido de ARNr celular de algunas poblaciones bacterianas. Si no es posible medir la fracción de la biomasa activa y relacionarla con la concentración de sustratos en el reactor y el efluente, por

lo menos sería posible estudiar el efecto de la concentración de sustratos en la fracción de la biomasa activa, mediante el análisis en los cambios del contenido de ARNr de los organismos, así podría diferenciarse las poblaciones de rápido crecimiento (estrategia r, poblaciones con una constante de media saturación alta), de aquellas poblaciones de lento crecimiento (estrategia k, poblaciones con una constante de media saturación baja, que con frecuencia son de lento crecimiento) y establecerse un posible cambio en la estructura de las comunidades estudiadas.

El estudio de la dinámica poblacional de los organismos y de las comunidades, que se encuentran presentes en los sistemas de lodos activados, es uno de los temas que ha despertado interés desde hace tiempo, en el entendimiento de la necesidad de comprender los procesos que se llevan a cabo en los sistemas biológicos de tratamiento, y de identificar a los organismos responsables de la remoción de sustratos. En primera instancia se usaron técnicas de cultivo en medios enriquecidos y posteriormente, gracias a los avances realizados en diferentes métodos de estudio, técnicas sofisticadas como son: microautoradiografías (Microautoradiography o MAR), para caracterizar el consumo de sustratos determinados; microscopio confocal láser (Confocal Laser Scanning Microscope o CLSM), análisis de imágenes para visualizar a los organismos y el uso de microelectrodos, para caracterizar las condiciones fisicoquímicas en las que se encuentran los microorganismos y hibridación de fluorescencia *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridization o FISH, por sus siglas en Inglés), por mencionar algunas.

La hibridación *in situ* es una técnica que utiliza pruebas de oligonucleótidos (marcadas en el extremo 5' con un fluorocromo), que son complementarias a secciones específicas del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr), lo que permite la identificación filogenética de bacterias en ensamblajes mixtos sin necesidad de cultivo. Se basa en que cada ribosoma en la célula bacteriana que contenga una copia de ARNr de las subunidades 5S, 16S ó 23S es teñido por una prueba molecular durante el proceso de hibridación, siendo el gran número de ribosomas por célula el amplificador natural de la señal fluorescente.

De los estudios realizados en sistemas de tratamiento de aguas residuales se han identificado miembros de 13 divisiones bacterianas, de las cuales los organismos pertenecientes a Proteobacteria son los más abundantes, especialmente los miembros pertenecientes al grupo Betaproteobacteria son los que se encuentran con mayor frecuencia (Wagner *et al.*, 2002).

El empleo de diferentes técnicas ha permitido estudiar con mayor detalle la actividad de los microorganismos permitiendo el desarrollo de alternativas para caracterizar a la biomasa presente en los sistemas de tratamiento (Andreottola *et al.*, 2001b), además de permitir una evaluación visual rápida de las diferentes poblaciones de microorganismos (da Motta *et al.*, 2001).

En diversas investigaciones en sistemas biológicos de tratamiento, cuyos propósitos han sido la determinación tanto de la estructura como de la función de las comunidades bacterianas (Amann *et al.*, 2001), se han puesto de manifiesto las ventajas de las nuevas metodologías de estudio y, debido a que en los sistemas biológicos de tratamiento uno de los procesos más importantes es la remoción de sustancias nitrogenadas, existen muy variados trabajos en relación a este proceso por ejemplo, con el objeto de establecer la existencia e identidad de organismos nitrificadores y deamonificadores en sistemas de biopelículas (Helmer - Madhok *et al.*, 2001), logrando establecer la participación de organismos pertenecientes a la subclase Betaproteobacteria.

La ecología de bacterias nitrificadoras, así como su distribución espacial en las biopelículas, han sido estudiadas (Aoi *et al.*, 2000) encontrando que la ecología de los organismos presentes depende fuertemente de las condiciones de operación, como es el caso de la concentración del nitrógeno amoniacal que entra y/o se produce en el sistema, el cual afecta la distribución de los organismos en la biopelícula. Además se han estudiado las cinéticas de degradación de sustratos *in situ* en poblaciones nitrificadoras en biopelículas, empleando microelectrodos simultáneamente con la hibridación *in situ* (Okabe *et al.*, 2001), logrando una alta resolución temporal y espacial logrando relacionar las tasas de consumo de sustratos con la ubicación de los organismos en la estructura de la biopelícula.

Se ha investigado el efecto de las variaciones en la proporción carbono orgánico / nitrógeno (Ballinger *et al.*, 2001), estableciendo que el aumento en la proporción de carbono orgánico tiene un efecto negativo en el proceso de nitrificación, y que este efecto está acompañado por un marcado cambio en la estructura de la comunidad debido a que la mayor parte de las bacterias nitrificadoras son autótrofas. Las interacciones entre bacterias autótrofas y bacterias heterótrofas han sido estudiadas también en reactores de biopelículas (Kindaichi *et al.*, 2004), donde se estableció que las bacterias nitrificadoras (ya sea que oxiden nitrito o amoníaco) son capaces de sostener a las bacterias heterotróficas por medio de la producción de productos solubles.

Se ha investigado a los organismos responsables de la oxidación de nitrito y de amoníaco en el proceso de nitrificación en los reactores (Egli *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004), encontrando organismos del género *Nitrospira* spp. (oxidador de nitrito), organismos del género *Nitrosomonas* (oxidador de amoníaco) como organismos dominantes.

El empleo de la técnica FISH conjuntamente con otras técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction o PCR) y “denaturing gel gradient electrophoresis” (DGGE por sus siglas en Inglés), han mostrado ser eficientes en el monitoreo de cambios en la estructura de las comunidades microbianas, particularmente en el caso de *Nitrosomonas*. (Onuki *et al.*, 2000).

En un caso diferente (Eschenhagen *et al.*, 2003) en el que se estudiaron dos sistemas de lodos activados, el empleo de FISH no mostró diferencias importantes en la composición de las comunidades de ambas plantas sin embargo, el uso de otra técnica molecular conocida como “terminal restriction – fragment length polymorphism” (T – RFLP, por sus siglas en Inglés), una técnica basada en el análisis del Ácido Ribonucleico ribosomal o ARNr), indicó que existían diferencias en la estructura de las comunidades, análisis posteriores de ADNr (Ácido Desoxirribonucleico ribosomal) de la subunidad 16S (unidad Svedberg, que es una medida de la tasa de sedimentación) sugirieron diferencias sustanciales en la estructura de la comunidad microbiana.

En cuanto a estudios en la comunidad heterotrófica se ha observado, en reactores secuenciales por tandas (Sequencing Batch Reactor o SBR), que ésta parece ser dinámica y azarosa, en comparación con la comunidad nitrificante de los sistemas cuyo comportamiento es más estable (Miskin *et al.*, 2001).

La técnica FISH también se ha utilizado en estudios que involucran a los organismos acumuladores de fósforo (Polyphosphate Accumulating Organisms o PAOs, por sus siglas en Inglés), en los que se logró demostrar que *Acinetobacter* (originalmente propuesto como organismo responsable) no lleva a cabo la remoción de fósforo en los sistemas diseñados para tal efecto (Enhanced Biological

Phosphorus Removal o EBPR), y se han hecho investigaciones con el objeto de descubrir la identidad de los organismos importantes en la remoción de fósforo (Bond *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001), estableciendo la participación de organismos pertenecientes a Betaproteobacteria y el subgrupo β_2 del mismo, relacionados con el género *Rhodocyclus*, además de miembros de la clase Actinobacteria.

Por otra parte se ha observado que algunos organismos capaces de acumular fósforo, también son capaces de llevar a cabo la desnitrificación, en particular el organismo Candidatus *Accumulibacter phosphatis*, referido como DPAO o denitrifying polyphosphate-accumulating organism (Zeng *et al.*, 2003), aunque los organismos expuestos a diferentes modos de operación exhiben comportamientos fisiológicos diferentes (Falkentoft *et al.*, 2002).

El efecto de la proporción fósforo/carbono en los sistemas ha sido estudiado (Kong *et al.*, 2002), evidenciando que conforme la proporción fósforo/carbono disminuye existe un aumento en la proporción de organismos pertenecientes a la subclase Alfaproteobacteria y en menor proporción de Gammaproteobacteria, mientras que disminuye drásticamente la proporción de organismos del grupo Betaproteobacteria.

Las investigaciones no sólo se han realizado con la intención de identificar a los organismos responsables de la remoción de sustratos y responsables del buen funcionamiento de los sistemas, si no también de aquellos que compiten con los primeros causando el mal funcionamiento de las plantas de tratamiento. Tal es el caso de los organismos conocidos como GAOs (Glycogen Accumulating Organisms), que al competir con los PAOs ocasionan un mal desempeño en la remoción de fósforo, se han identificado a miembros de la subclase Alfaproteobacteria (*Sphingomonas* y *Defluvicoccus vanus*) como GAOs (Beer *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2004).

La técnica FISH tiene limitaciones metodológicas conectadas con la complejidad de la comunidad microbiana de lodos activados. La especificidad de la hibridación al sitio apropiado es específica y depende de las condiciones de hibridación y de lavado de las muestras, aunque la pérdida de microorganismos durante la hibridación no excede del 10% (Glöckner *et al.*, 1999). Sin embargo, el uso del método FISH ha mostrado ser de utilidad en la caracterización de las comunidades microbianas de los sistemas biológicos de tratamiento permitiendo, además de la identificación de grupos específicos de bacterias, realizar una estimación de la proporción en la que los diferentes grupos se encuentran en los sistemas, por otra parte su aplicación permite observar células que contienen al menos 30 ribosomas. Por lo que el empleo de la técnica es adecuado para estudiar el efecto de las fluctuaciones de la carga orgánica sobre la comunidad microbiana del lodo activado, al permitir observar cambios en el contenido ribosomal de los organismos, los cuales pueden estar relacionados a la tasa de crecimiento de los mismos y con el uso de los sustratos, como se explicó anteriormente.

3. SISTEMAS ESTUDIADOS

3.1 Generalidades

Existen diferentes tipos de reactores que son utilizados en las aplicaciones ambientales, individualmente son designados como reactores de “crecimiento suspendido” y reactores de “biopelículas”, los reactores usados en el crecimiento suspendido se muestran en la Figura 2.

Reactores básicos

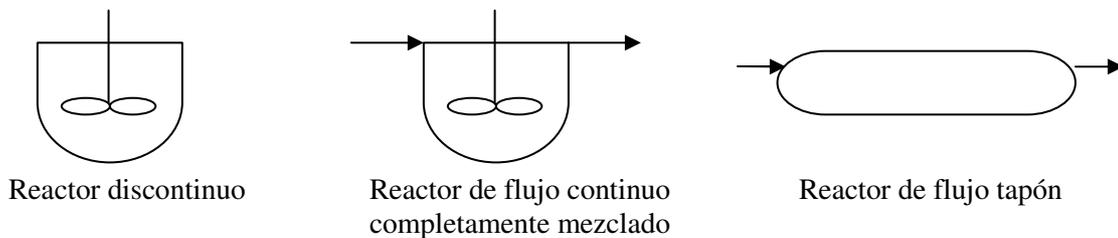


Figura 2 Algunos tipos de reactores utilizados en aplicaciones ambientales

Los reactores discontinuos, también conocidos como “reactores batch” son llenados con el líquido a tratarse, el cultivo bacteriano a utilizarse y nutrientes requeridos, los componentes son mezclados, si es necesario se suministra oxígeno y las reacciones bioquímicas se llevan a cabo sin añadir nada más hasta que las reacciones se completan.

En los reactores de flujo continuo el líquido a ser tratado es introducido y removido continuamente del reactor.

En el reactor de flujo tapón la concentración de sustratos y de microorganismos varía a través del reactor, el flujo se mueve a través del reactor sin ser mezclado con otros flujos que hayan entrado previa o posteriormente.

Estos son sólo algunos de los reactores utilizados en sistemas diseñados para el tratamiento de aguas residuales y se muestra particularmente los que son utilizados en el proceso de lodos activados, el cual tiene diferentes modificaciones que pueden agruparse en:

a) Modificaciones en la configuración física del sistema (Figura 3).

1) **Flujo tapón.** Tiene tanques de aireación largos y estrechos en los que el agua residual entra por un extremo y sale por el opuesto.

2) **Completamente mezclado.** El agua residual es distribuida uniformemente a través del sistema de tratamiento.

3) **Estabilización de contacto.** El agua residual es mezclada con lodo activado en el tanque de contacto, el agua tratada fluye hacia el tanque de sedimentación donde ocurre la separación de la biomasa, que es posteriormente introducida al tanque de estabilización donde hay aireación y ocurre la oxidación de los sustratos almacenados en las células.

4) **Lodo activado con selectores.** La función del selector es cambiar las condiciones del sistema para seleccionar organismos con buenas características de sedimentación, evitando problemas de separación de biomasa en el agua del efluente.

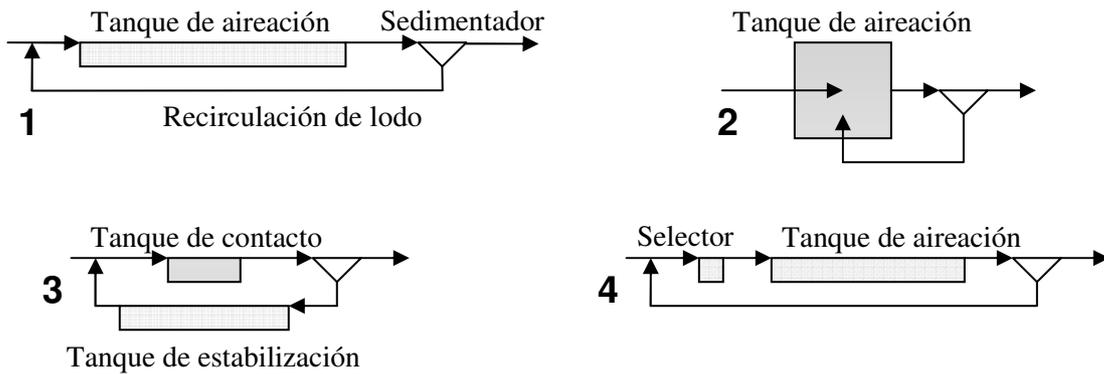


Figura 3 Modificaciones en la configuración del proceso de lodos activados, los números en los dibujos corresponden a las descripciones realizadas en el texto

Las modificaciones en la configuración de los reactores tienen implicaciones en la concentración de los contaminantes y en la tasa de consumo de oxígeno en el reactor (Figura 4).

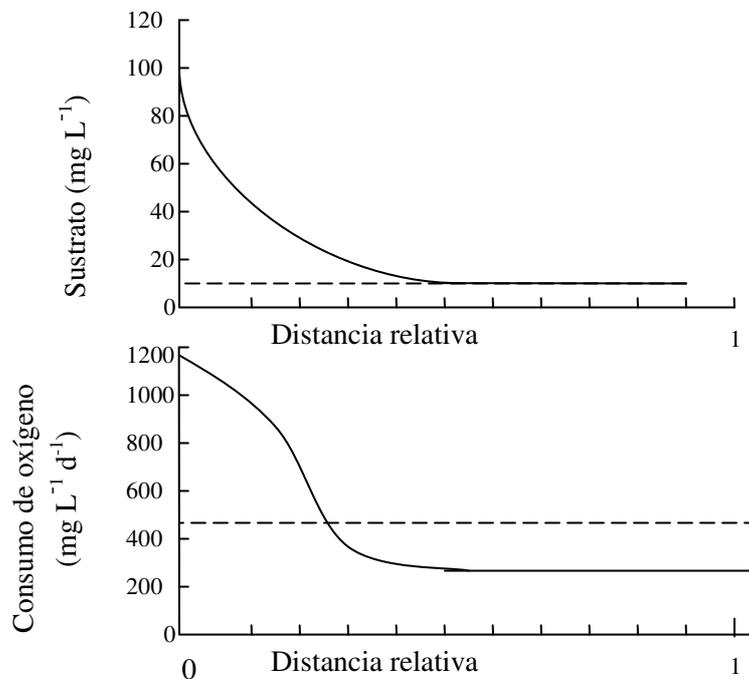


Figura 4 Cambios en la concentración de los contaminantes y la tasa de consumo de oxígeno en relación a la longitud del reactor para el flujo tapón (línea sólida) y un reactor completamente mezclado (línea discontinua)

b) Modificaciones basadas en la forma en que se suministra o distribuye el oxígeno.

1) **Aireación convencional.** El oxígeno es distribuido uniformemente en el tanque de aireación.

2) **“Tapered Aeration”.** El suministro de aire es incrementado en la parte inicial del tanque de aireación de un sistema con flujo tapón, de tal forma que la demanda de oxígeno y el suministro del mismo son igualados.

3) **Oxígeno puro.** Concentraciones altas de oxígeno disuelto son requeridas con concentraciones altas de SSLM, obteniendo mejores características de sedimentación en el lodo y permite una mayor carga volumétrica ($\text{kg DBO}_5 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) en el sistema.

c) Modificaciones basadas en la carga orgánica.

- 1) **Convencional.**
- 2) **Aireación modificada**
- 3) **Carga alta**
- 4) **Aireación extendida**

En los inicios del proceso de lodos activados había muy poca o ninguna base teórica para el diseño de las plantas de tratamiento, las modificaciones basadas en la carga se relacionaron a criterios convencionales, en los años siguientes la base teórica fue desarrollada y ahora los criterios empíricos de la carga orgánica pueden ser interpretados con parámetros fundamentales como el tiempo de retención de sólidos (θ_x) (Tabla 1).

Tabla 1 Valores Normales para Varios Factores en Sistemas de Lodos Activados

Modificación del Proceso	Carga Volumétrica kg DBO ₅ m ⁻³ d ⁻¹	SSLML mg L ⁻¹	Carga Orgánica kg DBO ₅ kg SSLML ⁻¹ d ⁻¹	Eficiencia de Remoción DBO ₅	Tiempo de Retención de Sólidos (θ_x)
Aireación extendida	0.3	3,000 - 5,000	0.05 - 0.2	85-95	>14
Convencional	0.6	1,000 - 3,000	0.2 - 0.5	95	4 - 14
“Tapered Aeration”	0.6	1,000 - 3,000	0.2 - 0.5	95	4 - 14
Aireación Modificada	1.5 - 6	300 - 600	0.5 - 3.5	60-85	0.84 - 4
Aireación de alta tasa	1.5 - 3	5,000 - 8,000	0.2 - 0.5	95	4 - 14

3.2 Planta de Tratamiento en la Empresa Cognis-Henkel

Una de las plantas de tratamiento estudiadas trata aguas de carácter industrial, se encuentra localizada al interior de la empresa Cognis Mexicana – Henkel con domicilio en Calzada de la Viga S/N, Fraccionamiento los Laureles, Tulpetlac, en el municipio de Ecatepec de Morelos en el Estado de México. La empresa fabrica químicos básicos concretamente surfactantes, la planta de tratamiento funciona como un reactor secuencial por tandas (SBR), es por tanto un sistema discontinuo que además utiliza membranas para llevar a cabo la ultrafiltración con el objeto de separar los sólidos en el agua ya tratada, el tiempo de retención de sólidos es de 20 días y el sistema se utiliza únicamente para la oxidación bioquímica de las fuentes de carbono orgánico, no se considera llevar a cabo procesos de nitrificación ni desnitrificación o de remoción de fósforo (Figura 5).

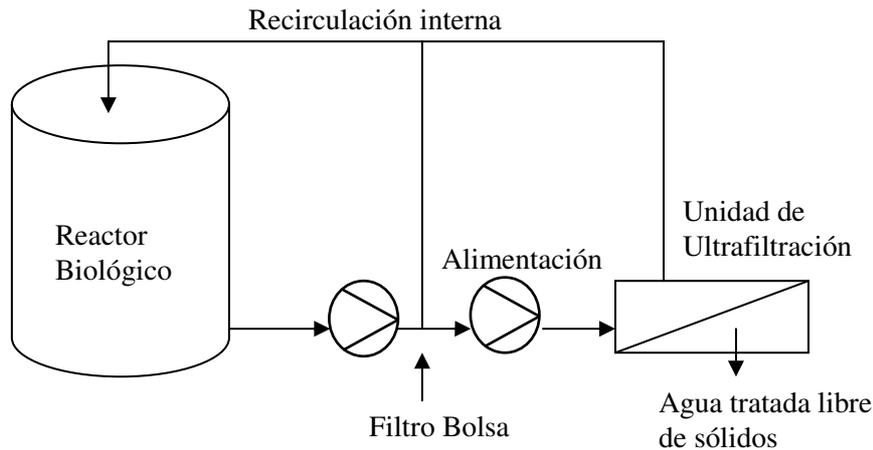


Figura 5 Esquema general de la planta de tratamiento en la empresa Cognis-Henkel, el esquema no está a escala

Los procesos SBR tienen características particulares que se describen a continuación. Las reacciones metabólicas y la separación de los sólidos tienen lugar a diferentes tiempos en el mismo reactor, en una secuencia de tiempo bien definida y repetida de manera continua, pero el volumen de agua que es introducido al reactor varía. El proceso SBR es caracterizado por una serie de fases en el proceso de tratamiento, cada fase durando un periodo definido de tiempo, si no existe agua residual disponible para ser tratada el sistema se encuentra en una fase de inactividad. Las fases en el proceso son: llenado del reactor, reacción, sedimentación y decantación, las cuales se sintetizan en la Figura 6. La duración de las fases en el sistema SBR es controlada por un cronómetro que puede ser fácilmente ajustado a la situación real, por lo que el SBR ofrece gran flexibilidad a condiciones cambiantes de operación (Morgenroth y Wilderer, 1999).

El control y la repetición periódica del proceso a corto plazo permiten, en un empleo prolongado, el mejoramiento de ciertos efectos tales como la actividad enzimática, la acumulación de productos metabólicos, la selección y enriquecimiento de grupos específicos de organismos. Las bacterias son expuestas a mayores concentraciones de sustrato en el comienzo del ciclo, seguido por un periodo de muy baja concentración del sustrato al final del ciclo, durante las condiciones de alta concentración de sustrato algunas bacterias pueden acumular productos de almacenamiento, los cuales son usados durante los periodos de baja concentración de sustrato externo, estos cambios en la concentración de sustratos mejoran la sedimentación (Morgenroth y Wilderer, 1999).

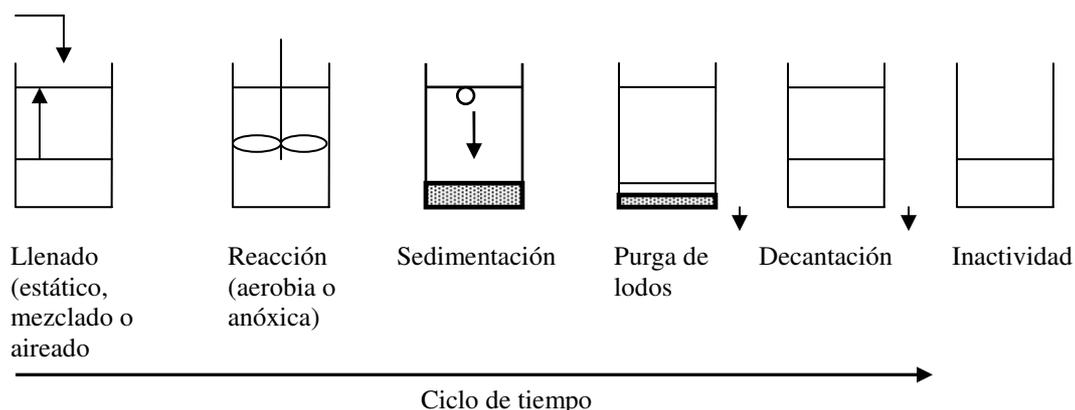


Figura 6 Fases de un ciclo SBR, el orden puede alterarse dependiendo del objetivo del proceso

Para el sistema de tratamiento en la empresa Cognis-Henkel el diagrama de flujo del proceso de tratamiento del agua residual se ilustra en la Figura 7. El agua residual es descargada a un separador de grasas y aceites y en su mayor parte proviene de los procesos de fabricación, aunque también se tratan aguas provenientes de los servicios sanitarios. Posteriormente el agua pasa a un tanque con aireación diseñado con el propósito de alcanzar la homogenización y óptima concentración de oxígeno disuelto en el agua de alimentación, antes de que ésta entre al reactor biológico, donde se alimenta un promedio de 62 m^3 .

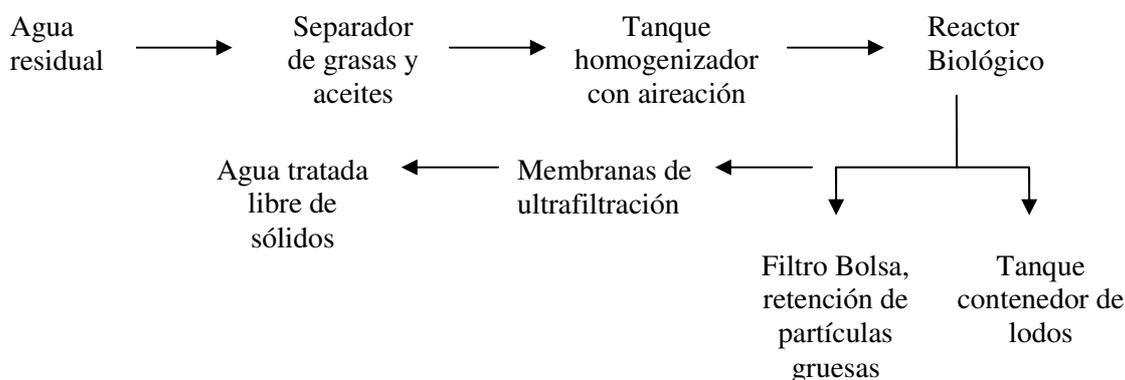


Figura 7 Proceso de tratamiento del agua residual

En el reactor biológico la biomasa es cultivada para alcanzar concentraciones de 10 g L^{-1} (medida como sólidos totales) y el aire es distribuido por medio de difusores. Para que el cultivo de la biomasa sea estable se remueve el lodo excedente de forma intermitente hacia un tanque contenedor, empleando para ello la información obtenida mediante el análisis de la concentración de sólidos totales. El oxígeno disuelto se mantiene en valores de 2 mg L^{-1} , pero puede variar entre $1 - 3 \text{ mg L}^{-1}$ dependiendo del requerimiento del proceso.

El reactor está equipado con un sistema de aspersores rociador de antiespumante, activado cuando los niveles de espuma son altos, la presión hidrostática del agua es usada como control de nivel, lo que evita posibles lecturas erróneas debido al nivel de espuma. En caso de que exista espuma, se activa el

rociador antiespumante, el líquido que alimenta a éste proviene de un tanque que es llenado con agua de servicios y bombeado a los aspersores, no se emplea el uso de antiespumantes químicos, únicamente en caso de que la espuma no pudiera ser controlada se seleccionaría el uso de alguno.

Después del reactor biológico se halla instalado un filtro bolsa que retiene los sólidos del agua del proceso, pero no retiene partículas finas. La planta de tratamiento cuenta con un sistema de membranas de ultrafiltración que actúan como barreras físicas para todo el material sólido, este sistema se encuentra instalado después del filtro bolsa, opera de forma independiente y finalmente se obtiene el agua tratada y filtrada libre de sólidos.

3.3 Planta de Tratamiento en el Club Náutico Avándaro

El Club Náutico Avándaro se localiza en el Municipio de Valle de Bravo en el Estado de México, el agua que trata la planta proviene de los sanitarios y de la elaboración de alimentos en el club. Un esquema general se muestra en la Figura 8.

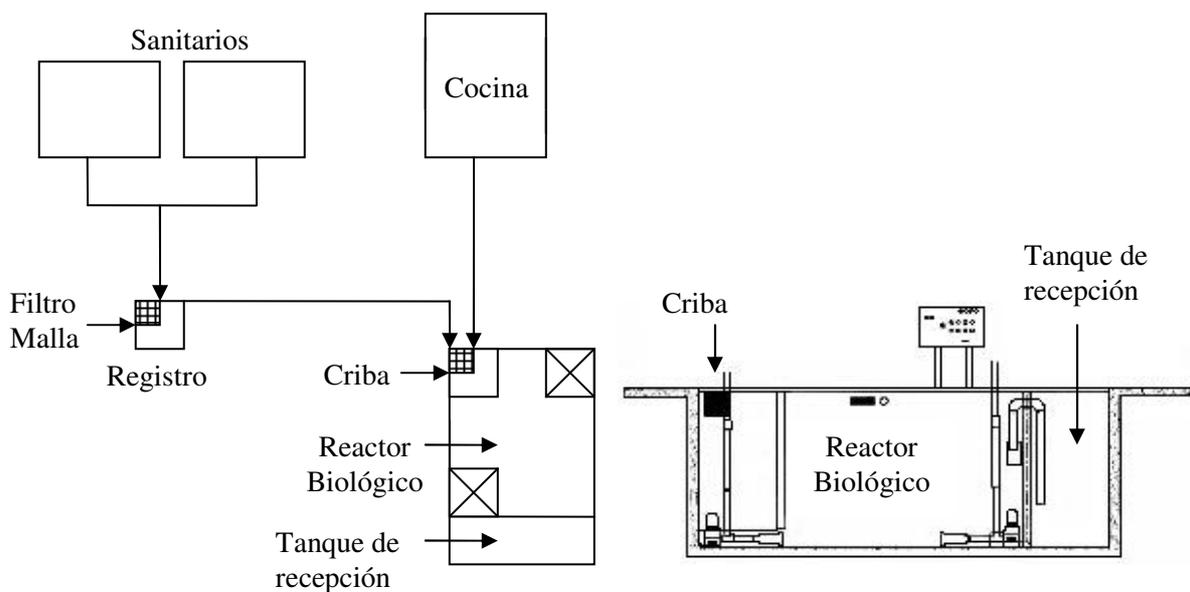


Figura 8 Esquema de la planta de tratamiento en el Club Náutico Avándaro, a la izquierda se observa la ubicación relativa de las estructuras involucradas en la generación y tratamiento del agua residual, a la derecha se muestra una vista lateral del reactor biológico (24 m³) y el tanque de recepción (6 m³), los esquemas no están a escala

Es importante mencionar que durante el periodo de lunes a viernes (generalmente) no existe ingreso de agua residual hacia la planta de tratamiento sin embargo, los días sábado y domingo (generalmente), que son los días en que hay actividades en el club, el ingreso de agua residual hacia la planta de tratamiento es importante, en promedio recibe 5 m³ d⁻¹. El sistema, en cuanto a las modificaciones del proceso de lodos activados se refiere, es una planta de tratamiento de aireación extendida que opera, debido a las características del sitio, como un sistema discontinuo. Las aguas residuales tratadas son aguas grises, cuya característica es una baja concentración de DBO (alrededor de 100 mg L⁻¹).

El agua proveniente de los sanitarios y regaderas pasa por un filtro malla y es descargada en un registro con capacidad de 1 m³, desde el cual es bombeada hacia el reactor biológico. Antes de entrar al reactor biológico, el agua proveniente tanto de los sanitarios como de la preparación de alimentos, pasan a través de una criba, en el reactor la aireación y mezcla de la biomasa y de los sustratos es realizada por medio de dos bombas.

La planta de tratamiento opera con dos ciclos de aireación diferentes dependiendo de los días de la semana, de lunes a viernes el ciclo de operación es de 20 min de aireación y 40 min sin aireación, el ciclo de fin de semana los tiempos se invierten siendo el de aireación de 40 min y sin aireación 20 min. Después del reactor biológico se encuentra un tanque receptor, el paso del agua del reactor biológico hacia el tanque receptor se realiza por medio de un sifón, por lo que el flujo del agua depende del nivel al que se encuentra en el reactor biológico. En el tanque receptor el agua tratada es almacenada y posteriormente descargada en las áreas verdes cercanas al sistema de tratamiento del club. Es necesario mencionar que no se aplica ningún tratamiento de desinfección al agua del efluente.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Comprobar si la carga orgánica del sistema de tratamiento de aguas residuales por lotes tiene efecto en la estructura de la comunidad microbiana del lodo activado en diferentes formas de operación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar dos plantas de tratamiento de aguas residuales: una planta que trata aguas de tipo industrial con una separación adicional de lodo activado por medio de filtración con membranas y una planta que trata aguas residuales de tipo doméstico.
- Caracterizar la biomasa de los lodos activados por métodos tradicionales.
- Caracterizar la estructura de la comunidad microbiana de los lodos activados, en cuanto a abundancia y composición de microorganismos determinando las posibles variaciones relacionadas con los cambios en la carga orgánica de los sistemas.
- Caracterizar la eficiencia del tratamiento en los parámetros DBO₅, nitrógeno y fósforo.

5. METODOLOGÍA

5.1 Programación de los Muestreos

Las fechas de muestreo en la planta de tratamiento de la empresa Cognis–Henkel, se establecieron en intervalos de un mes, abarcando el periodo de septiembre 2005 – junio 2006, dado que no existió la posibilidad de establecer un calendario que guardara relación con cambios en los periodos de fabricación de productos en la empresa, o con la carga orgánica del sistema.

Se tomó una muestra de biomasa cuando el reactor estaba en el periodo de inactividad, con el objeto de tener representada a la comunidad microbiana antes del ingreso de sustratos al sistema, se tomó otra muestra de biomasa cuando el reactor tenía varias horas de estar funcionando en el ciclo de mezcla, con el objeto de tener representada a la comunidad microbiana después del ingreso de sustratos en el sistema. Las dos muestras de biomasa mencionadas fueron tomadas en el mismo día. Los datos correspondientes a DBO₅, nitrógeno total y fósforo total fueron proporcionados en todo momento por el personal que se encuentra a cargo de la operación de la planta y estos datos corresponden a los días en que se tomaron las muestras de biomasa.

Los muestreos realizados en la planta de tratamiento del Club Náutico Avándaro se programaron de acuerdo al Calendario de Regatas de la Federación Mexicana de Vela, donde se ubicaron los eventos a realizarse en el club, con el objetivo de realizar el muestreo en aquellos días en que la actividad en el club fuera importante. Para tal efecto se establecieron los eventos en que habría asistencia durante el periodo de estudio, que comprendió el periodo de agosto 2005–junio de 2006, en función de las categorías que tendrían participación en las regatas y por tanto del número de personas estimado que asistiría al club, de igual forma tratando de realizar la toma de muestras de forma regular (mensualmente).

Debido a la periodicidad en las actividades del club y por tanto, del funcionamiento de la planta de tratamiento a lo largo de la semana como se explicó anteriormente, se realizó un muestreo antes de que se realizaran los eventos en el club, para tener representada a la comunidad microbiana y los parámetros DBO₅, N y P durante el periodo de poca o nula actividad (generalmente los viernes), y se realizó otro muestreo el último día de la realización de las regatas (generalmente los domingos), para tener representada a la comunidad microbiana y los mencionados parámetros después de la actividad y por tanto, del ingreso de sustratos al sistema.

5.2 Muestras de Biomasa

Las muestras de biomasa fueron tomadas en botellas de polietileno (PET) de 60 mL, la muestra para bacterias Gram negativas fue fijada inmediatamente con formaldehído, y la muestra para bacterias Gram positivas fue fijada con etanol, ambas muestras a una concentración final de 2% v/v durante por lo menos una hora y como máximo 24 horas (Pernthaler *et al.*, 2002), fueron transportadas en hielo al laboratorio.

5.3 Muestras Para Análisis de DBO₅, Nitrógeno y Fósforo

La información necesaria de la planta Cognis – Henkel con respecto a los parámetros aquí mencionados, fue proporcionada por el personal a cargo de la operación de la planta de tratamiento.

En el caso de la planta de tratamiento del Club Náutico Avándaro, las muestras se obtuvieron del tanque receptor (Figura 8). Las muestras para el análisis de DBO₅ se tomaron en botellas PET con un volumen de 1 L. Las muestras para el análisis de nitrógeno y fósforo se tomaron en botellas PET, se tomó una muestra con duplicado para realizar análisis de contenido total de nitrógeno y fósforo, y se tomó otra muestra con duplicado para realizar análisis de la fracción soluble inorgánica, para esto el agua obtenida del tanque receptor se filtró a través de un filtro de ésteres de celulosa con apertura de poro 0.45 µm (Millipore) recuperando el filtrado. A todas las muestras para el análisis de nitrógeno y fósforo se les agregó cloroformo (un par de gotas) para su preservación y fueron transportadas en hielo al laboratorio, donde se congelaron hasta su posterior análisis.

5.4 Análisis de Biomasa

La caracterización de los sólidos en ambas plantas de tratamiento se realizó de acuerdo a lo dispuesto en la norma oficial mexicana NMX – AA – 034 para la determinación de sólidos, en todas las muestras se determinó el contenido de sólidos suspendidos del licor mezclado (SSLM) y sólidos suspendidos volátiles del licor mezclado (SSVLM) haciendo uso de filtros de fibra de vidrio (GFF).

5.5 Análisis de la Comunidad Microbiana

Para el análisis de la estructura de la comunidad microbiana se utilizó la técnica de hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH). En el laboratorio, se tomaron submuestras que fueron diluidas con el objeto de facilitar la posterior cuantificación de células al microscopio, la dilución apropiada se determinó de acuerdo al origen de la muestra y revisando con ayuda del microscopio la cantidad de bacterias visibles después de filtrar cierto volumen, siendo menor la dilución (≈ 70 veces) para la muestra del Club Náutico y mayor (≈ 600 veces) para la muestra Cognis–Henkel, se utilizó agua libre de partículas para realizar las diluciones (agua filtrada a través de filtros de policarbonato con apertura de poro 0.22 µm).

Posteriormente las muestras diluidas se sometieron a sonicación (VWR Scientific Branson Sonifier 450), con el propósito de liberar las células de los flóculos y homogenizar las muestras para permitir la cuantificación posterior de las bacterias presentes, la sonicación se realizó sobre hielo para evitar el calentamiento excesivo de la muestra durante el proceso. La intensidad en los pulsos de ultrasonido y la duración de los mismos se determinó aplicando diferentes intensidades y duraciones a las muestras y observando éstas bajo el microscopio para comprobar la efectividad en la separación de las células y asegurar la integridad de las mismas, una vez establecido el procedimiento se aplicó por igual a las muestras obtenidas posteriormente, siendo la duración de la sonicación de 2 minutos, los pulsos de 50% y potencia de salida de 2.0.

Después de la sonicación las células se colectaron por medio de filtración en filtros de policarbonato (Poretics, USA) con apertura de poro 0.22 μm y diámetro 47 mm, empleando además filtros de ésteres de celulosa (Millipore, USA) con una apertura de poro de 2 μm y diámetro de 47 mm como soporte, lo que permite que la distribución de las células en el filtro de policarbonato de 0.22 μm sea más homogénea. Antes de que finalizara la filtración se agregó agua libre de bacterias (15 mL) para retirar el exceso del fijador que quedara aun en la muestra, después se permitió filtrar totalmente el agua remanente. Posteriormente los filtros se dejaron al aire sobre papel secante para eliminar el exceso de humedad lo que permitió su almacenamiento en congelación (Pernthaler *et al.*, 2002) hasta su procesamiento para realizar la técnica FISH.

Debido a que en la literatura (Glöckner *et al.*, 1999; Zilles, 2001; Ravenschlag *et al.*, 2001; Tsai y Liu, 2001; Uphoff, 2001) se han reportado condiciones de hibridación y lavado de las muestras que difieren entre sí para una misma prueba de oligonucleótidos (en particular aquellas para los grupos Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria y Bacteroidetes), se procedió a realizar la hibridación para aquellas condiciones reportadas como eficientes, se realizó la observación y cuantificación de las células hibridadas en las muestras para elegir la mejor condición de hibridación y lavado de acuerdo no solamente al número de células que se observó, si no también a la especificidad de las condiciones en sí, con lo cual se estableció el protocolo a seguir para realizar la hibridación *in situ* en todas las muestras (Tabla 2).

Tabla 2 Condiciones de Hibridación Usadas en Este Estudio

Prueba	Especificidad	Posiciones ARNr	F(%) ^a	NaCl(mM) ^b	Fluorocromo
EUB 338	Bacteria	16S, 338 - 355	35	80	Cy3*
NON 338	Control negativo		35	80	Cy3
BET 42a ¹	β -proteobacteria	23S, 1027–1043	0	40	Cy3
BET 42a ²	β -proteobacteria	23S, 1027–1043	0	40	Cy3
CF 19a	Bacteroidetes	16S, 319 – 336	0	40	FITC**
PLA 886	Planctomycetes	16S, 886 – 904	35	80	Cy3
SRB 385	δ -proteobacteria	16S, 385 - 402	35	80	Cy3
PAR 1457	<i>Paracoccus</i> (α -proteobacteria)	16S, 1457-1474	35	80	Cy3
GP 1199	Gram positivas	16S, 1199–1211	35	80	Cy3
ARCH 915	Archaea	16S, 915–935	35	80	Cy3

1: Hibridación realizada usando la sonda ARNr GAM 42a sin fluorocromo como competidor, ya que la secuencia es similar a la de la sonda BET 42a

2: Hibridación realizada sin usar la sonda GAM 42a como competidor

a: F= Formamida en el buffer de hibridación

b: NaCl en el buffer de lavado

* Cy3: Sulfoindocianina

** Fluoresceína – Isotiocianato

Para realizar la hibridación *in situ* se preparó el buffer de hibridación y el buffer de lavado de acuerdo a lo señalado en la Tabla 3. Las pruebas de oligonucleótidos (Omnichem Molecular) fueron preparadas a una concentración de 250 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ como solución stock, para lo cual se utilizó una solución isotónica (0.85% NaCl), las soluciones stock fueron almacenadas en la oscuridad y congeladas. Para realizar las hibridaciones la concentración de oligonucleótidos que se usó fue de 25 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$.

Tabla 3 Preparación de los Buffer de Hibridación y de Lavado

Reactivo	Concentración en el buffer de hibridación	Concentración en el buffer de lavado
NaCl	900 mmol L ⁻¹	De acuerdo a la prueba (mmol L ⁻¹)
Tris / HCl ^a	20 (mmol L ⁻¹)	20 (mmol L ⁻¹)
Formamida	De acuerdo a la prueba (%)	-----
0.5 M EDTA ^b pH 8	-----	5 (mmol L ⁻¹)
SDS ^c	0.01%	0.01%

a Tris: Tris [hidroximetil] aminometano

b EDTA: ácido etilen-diamin tetra acético titulado con NaOH a pH 8

c SDS: Dodecilsulfato de Sodio

Una vez preparados los buffer de hibridación y de lavado se procedió a preparar las mezclas de hibridación en tubos Eppendorf 0.5 mL, agregando 18 µL del buffer de hibridación y 2 µL de la prueba de oligonucleótidos correspondiente, esta mezcla de hibridación se dejó calentar en un bloque de ultratermostato (Termomixer Comfort, Eppendorf) a 46°C. Cada filtro fue seccionado (16–20 secciones) empleando un bisturí, cada sección fue marcada con un número usando un lápiz para identificar la prueba utilizada con cada sección de filtro durante la hibridación, cada sección de filtro fue colocado en el tubo Eppendorf correspondiente, conteniendo la mezcla de hibridación previamente calentada cuidando que hiciera contacto con el líquido y se dejó incubar a 46°C durante tres horas. Una vez transcurrido el tiempo de hibridación se retiraron los tubos del termostato y se procedió a colocar los tubos Eppendorf llenos con el buffer de lavado y dejándolos calentar a 48°C, se transfirieron las secciones de filtro a los tubos de lavado que contenían el buffer adecuado y precalentado y se dejaron incubar durante 15 minutos.

Una vez terminado el tiempo de lavado se retiraron los tubos, y las secciones de filtro se colocaron en una caja petri durante varios minutos con agua libre de bacterias para ser lavadas, posteriormente se secaron al aire sobre papel secante. Para contrateñir, las secciones de filtro se colocaron sobre un portaobjetos con la parte que contenía las bacterias hacia arriba y se cubrieron (5–10 µL) con DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol, SIGMA) a una concentración de 1 µg mL⁻¹, se dejó incubar durante 4 minutos. Posteriormente las secciones de filtro fueron colocadas en una caja petri con etanol al 80% durante 15 minutos para remover cualquier tinción no específica, a lo que siguió un lavado en agua libre de bacterias dejando secar al aire posteriormente sobre papel secante.

Las muestras fueron montadas usando Vecta Shield (Vector, USA) como agente antiblanqueante en contacto con el filtro y aceite de inmersión para realizar la inspección con el objetivo 100x. La fluorescencia del fluorocromo Cy3 disminuye rápidamente bajo la luz ultravioleta en el microscopio de epifluorescencia, por lo que el conteo de las células se hizo primero utilizando el filtro para visualizar la emisión del fluorocromo Cy3 y posteriormente el filtro para la emisión de DAPI, la longitud de onda de excitación y emisión correspondiente se encuentra en la Tabla 4.

Tabla 4 Fluorocromos Utilizados

Fluorocromo	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Color
DAPI	365	395	Azul
Cy3	550	570	Naranja / Rojo
FITC	492	598	Verde / Amarillo

En la observación de las muestras al microscopio se contaron las células hibridadas hasta alcanzar un número de por lo menos 300 células, esto se realizó en diferentes campos en la sección del filtro. Para las células teñidas con DAPI se contaron células hasta alcanzar un número de por lo menos 500, lo que se realizó en diferentes campos en la sección del filtro. El conteo de las células teñidas con DAPI se realizó en la misma sección de filtro que fue sometida al proceso de hibridación con la prueba general para bacterias EUB 338.

El conteo de las células teñidas con DAPI es necesario para realizar una estimación del número total de células presentes en la muestra, la tinción con DAPI es específica para el ácido desoxirribonucleico (ADN), por lo que esta tinción no permite diferenciar entre células vivas y muertas. Por otra parte, el proceso de hibridación de las células empleando las pruebas de oligonucleótidos sólo permite observar aquellas células que tienen por lo menos 30 ribosomas. Así al realizar el conteo de células hibridadas se puede obtener una estimación de la proporción en la que se encuentra en la muestra un determinado grupo de bacterias, aquel para el que se haya utilizado la secuencia de oligonucleótidos.

Los conteos se realizaron con el objetivo 100× de un microscopio de epifluorescencia (Leica DMLB) y la ayuda de una rejilla en el ocular cuyas áreas al aumento utilizado eran conocidas (las áreas de un solo cuadro, una línea de cuadros o la cuadrícula en total), lo que sirvió para realizar el cálculo del número estimado de células de cada conteo realizado usando la Ecuación 3.

$$B = M \times \frac{A_f}{A_c} \times \frac{D}{V_f} \times 1.05 \quad (3)$$

Dónde: B = Número de bacterias estimado para cada conteo

A_f = Área de filtración efectiva del equipo de filtración usado

A_c = Área usada mientras se realizó el conteo (un cuadro, línea de cuadros o toda la cuadrícula)

M = Promedio de células contadas en el área usada para el conteo

V_f = Volumen filtrado de la muestra

D = Dilución

1.05 = Factor de corrección ([volumen total de muestra + fijador]/
volumen de muestra)

Los números de células obtenidos con los conteos realizados con la tinción con DAPI fueron considerados como números totales de células presentes en la muestra. El número total de células hibridadas fue calculado sumando las células hibridadas por la prueba EUB 338, PLA 886 (cuando las hubo) y ARCH 915 (cuando las hubo), debido a que la sonda EUB 338 no hibrida con células de Planctomycetes y posteriormente este total fue calculado como porcentaje de hibridación respecto al total de células presentes. Para cada prueba de oligonucleótidos utilizada se calcularon los porcentajes respectivos.

Una vez obtenidos los porcentajes de cada prueba utilizada se procedió a realizar la corrección de estos valores (Bel'kova *et al.*, 2003), restando a cada porcentaje obtenido aquel correspondiente a la prueba NON 338, que es el control negativo.

5.6 Estimación de la carga orgánica en los sistemas

Los datos necesarios para la planta de la empresa Cognis-Henkel fueron proporcionados por el personal que opera la planta de tratamiento.

En el caso de la planta de tratamiento del Club Náutico Avándaro no existen registros de gastos de agua en el sitio, los datos disponibles se refieren básicamente al total de personas que asistieron al club en los días que hubo eventos y en los días que se tomaron las muestras, estos datos fueron utilizados para hacer una estimación del flujo de agua residual hacia la planta de tratamiento, se asumió que el gasto de agua diario por persona fue el siguiente: a) uso sanitario 30 L; b) uso de regaderas 30 L y c) preparación de alimentos 10 L. Tampoco se obtuvieron registros de la concentración de la DBO₅ en el influente, por lo que se asumió un valor de 100 mg L⁻¹ para poder realizar la estimación de la carga orgánica.

5.7 Análisis de DBO₅ nitrógeno y fósforo

Para el análisis de la DBO₅, se utilizó el procedimiento recomendado en la norma mexicana NMX – AA – 28, se utilizó el método de dilución para hacer la determinación y se empleó el método yodométrico de acuerdo a lo establecido en la norma mexicana NMX – AA – 012 para realizar la valoración del oxígeno disuelto.

Para realizar la determinación de nitrógeno y fósforo total se utilizó el método de digestión simultánea con peroxodisulfato de potasio a 120°C durante 1 h, lo que forma nitrato y fosfato (Valderrama, 1981; Grasshoff, 1983). Debido a que la oxidación de los compuestos nitrogenados requiere el empleo de un medio alcalino para producir nitrato y que la oxidación de compuestos fosforados debe realizarse en un medio ácido, se empleó una solución oxidante que contiene ácido bórico e hidróxido de sodio además del peroxodisulfato todo disuelto en agua deionizada, esto permite que la reacción de oxidación comience a pH 11-12 y finalice a pH 5-6 debido a la reducción del peroxodisulfato en ácido sulfúrico a altas temperaturas.

A cada muestra para análisis conteniendo 10 mL se le agregó 3 mL de la solución oxidante, posteriormente se realizó la digestión en un autoclave con las condiciones antes mencionadas, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se procedió a realizar la dilución de las muestras (para fósforo 20 veces y para nitrógeno 100 veces), para su posterior análisis de la manera en que se describe a continuación para las fracciones inorgánicas.

Para el análisis de nitrógeno y fósforo inorgánico se utilizaron técnicas colorimétricas realizando la determinación por espectrofotometría en un equipo automatizado (Skalar Saplus System), para lo que se realizó previamente la dilución de la muestra usando agua deionizada y realizando una réplica analítica.

Para la determinación de nitrógeno amoniacal se utilizó la reacción de Berthelot, 1859 (citado en Koroleff, 1983a), técnica de formación de azul de indofenol (formado por la reacción entre fenol e hipoclorito, en la presencia de amonio) empleando una solución buffer de citrato de sodio (Solórzano, 1969; citado en Koroleff, 1983a) ya que la reacción requiere de un medio básico (pH 8-11.5), la lectura se realizó a 630 nm.

Para la determinación de nitrógeno de nitrato se utilizó la reducción de nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-) usando un sistema heterogéneo, una columna de cadmio-cobre para llevar a cabo la reacción, ya que la reducción de nitrato a nitrito requiere un $\text{pH} \approx 8$ se usó cloruro de amonio titulado con hidróxido de amonio como buffer, una vez realizada la reducción se procedió a determinar el nitrito producido (Grasshoff, 1983).

La determinación de nitrito se realizó por medio una modificación de la reacción de Griess-Ilovsay, en la que el nitrito se hace reaccionar con hidrocloreuro de sulfanamida, la diazotación resultante es una sal que se hace reaccionar con dihidrocloreuro de N-(1-naftil)-etilendiamina, lo que produce un colorante azoico rojo-violeta, la lectura se realizó a 543 nm (Grasshoff, 1983).

Para la determinación de fósforo reactivo soluble (ortofosfato, principalmente) se utilizó la reacción de los iones con molibdato ácido formando ácido molibdofosfórico y su posterior reducción a fosfomolibdeno dando un color azul, la lectura se realizó a 882 nm (Koroleff, 1983b).

Los resultados de todos los análisis correspondientes a fósforo y nitrógeno fueron obtenidos en unidades $\mu\text{mol L}^{-1}$, por lo que se procedió a calcular el resultado en mg L^{-1} , lo que se hizo multiplicando el valor en $\mu\text{mol L}^{-1}$ obtenido por el peso molecular del fósforo o nitrógeno, según fuera el caso y dividiendo el resultado entre 1000.

5.8 Evaluación de los resultados

Los datos se integraron a una base (Microsoft Excel) con la finalidad de evaluar gráficamente el comportamiento del sistema. Los resultados en las proporciones de grupos microbianos determinados se compararon con los cambios en los parámetros DBO_5 , nitrógeno y fósforo tanto total como inorgánico haciendo uso del software GraphPad-Prism e InStat (Motulsky, 1999). Con el objeto de determinar si existió no solamente algún tipo de relación entre la carga orgánica de los sistemas y la composición microbiana observada por el método FISH, sino también una relación entre las variables consideradas y la composición microbiana de las muestras, se realizó un análisis de regresión múltiple, con el cual también se pretendió determinar si existió un efecto de la composición microbiana en el desempeño de los sistemas estudiados.

6. RESULTADOS

6.1 Planta de Tratamiento Cognis–Henkel

Los datos para la planta de tratamiento Cognis–Henkel fueron obtenidos durante un periodo de 10 meses, desde septiembre 2005 – junio 2006. En esta planta de tratamiento se registraron cambios en la cantidad de células observadas con el método FISH, entre las muestras tomadas antes del ingreso de sustratos y las muestras tomadas después del ingreso de los mismos al sistema, a pesar de esto los cambios en la proporción de células hibridadas entre ambas muestras, a lo largo del periodo de estudio, no son explicados por las variaciones observadas en la carga orgánica. El análisis de regresión múltiple mostró que las variaciones observadas en la cantidad de células hibridadas, están asociados principalmente con las variaciones de los sólidos totales presentes en el sistema al momento de la toma de las muestras. Las variaciones en las proporciones de los grupos estudiados no pudieron ser explicadas por las variables consideradas en el análisis de regresión.

Los datos de los sólidos totales se muestran en la Figura 9. Las diferencias en el contenido de sólidos entre las muestras se deben a que las muestras tomadas antes del ingreso de agua residual corresponden al periodo de inactividad y por tanto cuando la biomasa en el reactor está sedimentada (ver Figura 6).

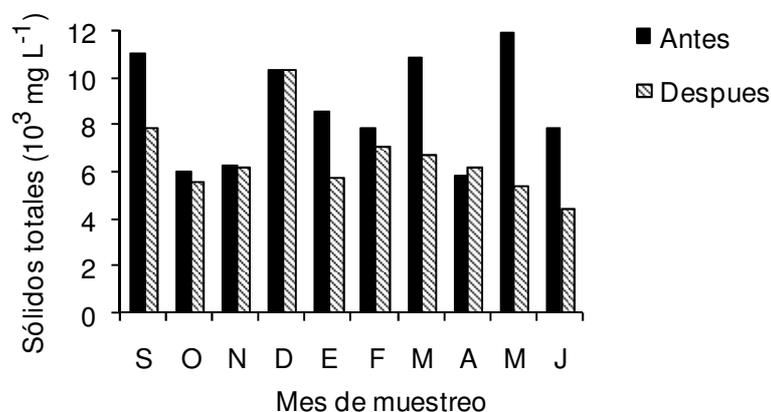


Figura 9 Concentración de sólidos totales en el reactor biológico en relación a la entrada de agua residual al mismo

Los números totales de células, estimados a través del conteo con la tinción DAPI, así como los números totales de células hibridadas se muestran en la Figura 10. Las diferencias en los números de células totales entre las muestras se explican por variaciones observadas en el contenido de sólidos. Las diferencias en los números de células hibridadas entre las muestras antes y después del ingreso de agua residual al sistema no fueron importantes, las excepciones más notables se observaron en los meses de enero, abril y mayo. Las diferencias observadas entre los meses de muestreo son explicadas por las variaciones en la cantidad de células totales principalmente.

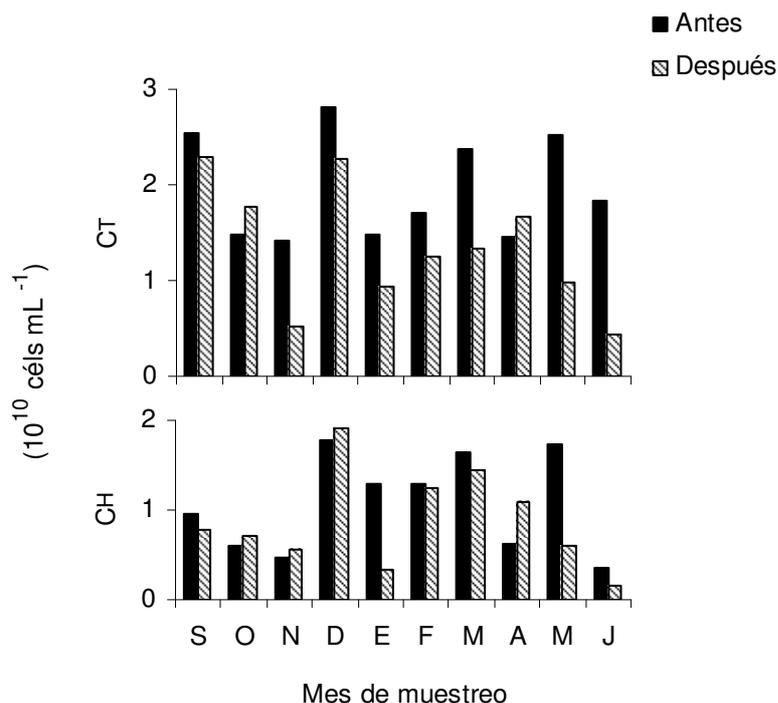


Figura 10 Número total de células (C_T) y número total de células hibridadas (C_H) estimado en las muestras en relación al ingreso de agua residual al reactor biológico

El porcentaje de hibridación en las muestras se observa en la Figura 11. Las diferencias entre las muestras se deben principalmente a las diferencias observadas en el número total de células.

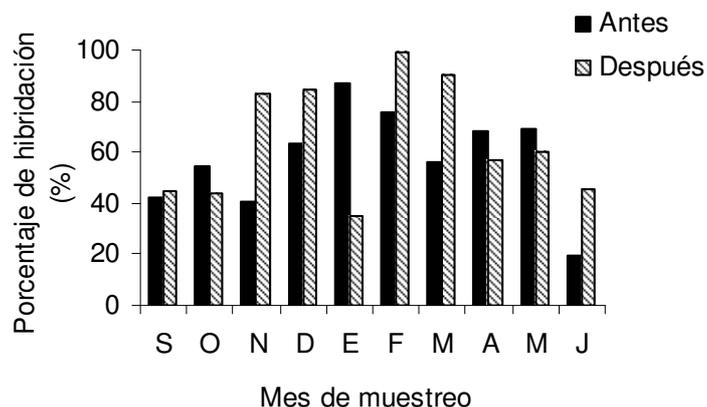


Figura 11 Porcentajes de hibridación en las muestras antes y después del ingreso de agua al reactor biológico

La estructura de la comunidad microbiana conforme a los resultados obtenidos por la técnica de hibridación *in situ*, se muestran en la Figura 12 para la muestra tomada antes del ingreso de agua residual al reactor biológico y para la muestra después del ingreso de la misma. Los porcentajes aquí presentados son porcentajes relativos al porcentaje total de hibridación en las muestras.

Se registraron numerosos cambios en las proporciones de bacterias observadas por medio de la hibridación *in situ* para cada uno de los grupos estudiados, no solamente entre las muestras tomadas antes y después del ingreso de agua al reactor biológico, sino también a lo largo del periodo de estudio. A pesar de que los cambios observados en el número de células hibridadas (Figura 10) no son tan pronunciados entre las muestras, el análisis de las muestras por medio de la técnica FISH mostró que los cambios en el contenido ribosomal de los diferentes grupos que componen la estructura de la comunidad son importantes. Los cambios observados no están relacionados con la carga orgánica, ni con parámetros como el contenido de nitrógeno o fósforo para ninguno de los grupos.

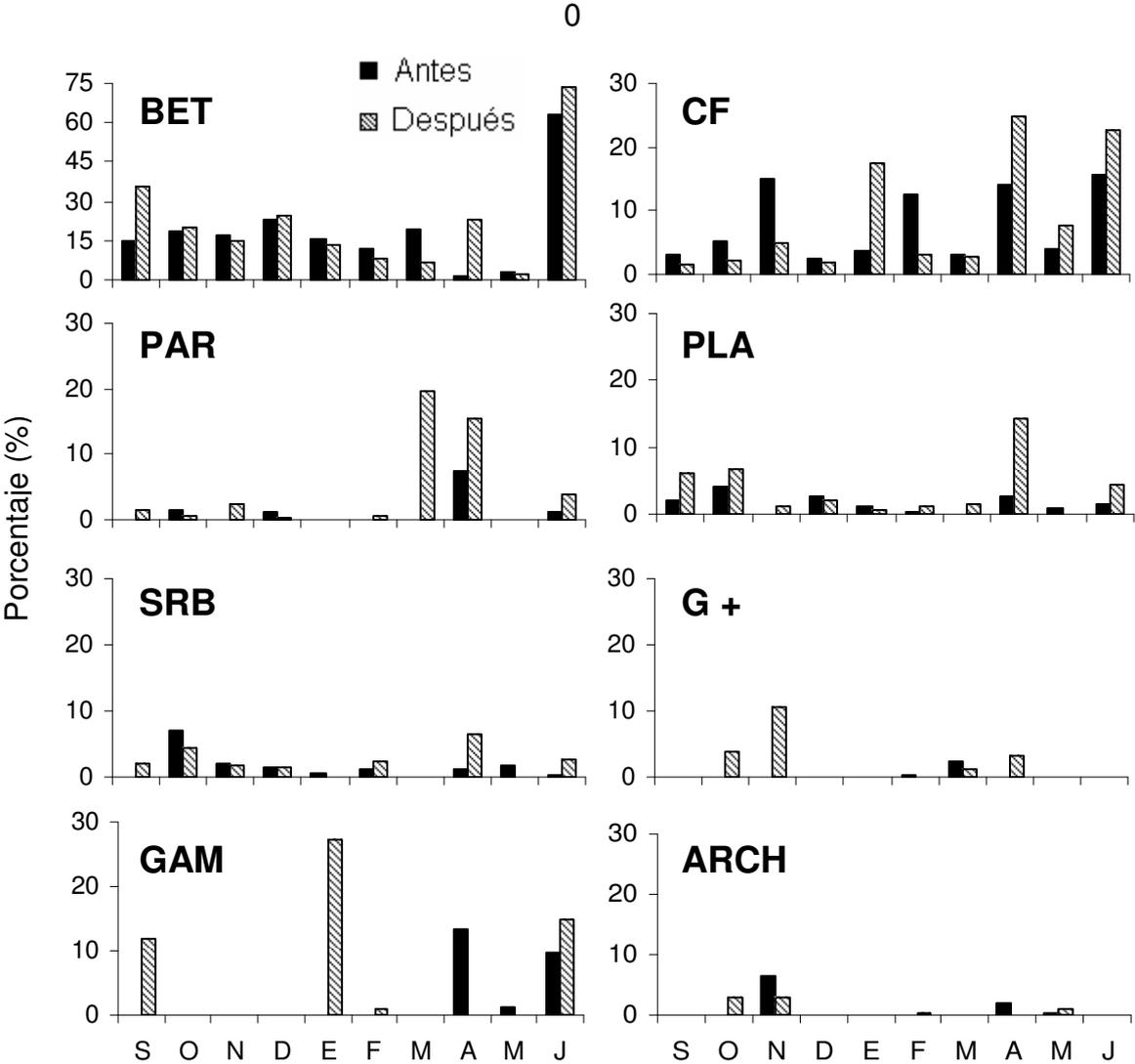


Figura 12 Composición de las muestras en relación al ingreso de agua residual al reactor biológico. Note la diferencia de escala en BET

Los cambios observados en las proporciones de grupos bacterianos observados pudieron deberse a diversos factores como cambios en la temperatura del agua y del pH, cambios en el tipo de sustratos disponibles, fenómenos de cometabolismo o incluso a depredación por parte de protistas, lo que se comenta en la sección de discusión. Contrario a lo esperado, no se observó una tendencia clara en la respuesta de los grupos a la carga orgánica del reactor, que por el modo de

operación y el tiempo de retención del lodo puede desarrollar una población autótrofa además de la población heterótrofa utilizada para el consumo de los sustratos, a este respecto debe considerarse que las pruebas de oligonucleótidos utilizadas son para grupos a nivel de *phylum* principalmente y que posiblemente el sistema de tratamiento tiene una comunidad muy diversa, y la dinámica de las poblaciones hacia el interior de los grupos estudiados resulta ignorada. Los grupos que se pudieron determinar con mayor frecuencia y en mayor proporción fueron Betaproteobacteria y Bacteroidetes.

Los datos obtenidos para la carga orgánica en la que fueron tomadas las muestras después del ingreso de agua residual al reactor biológico se muestran en la Figura 13. A pesar de las variaciones que se encontraron en la carga orgánica del sistema, ésta no tuvo efecto en la concentración de células hibridadas en la muestra, ni en los cambios observados en las proporciones de los grupos estudiados, por lo que estas variaciones no son de importancia aparente en el desempeño de la comunidad microbiana.

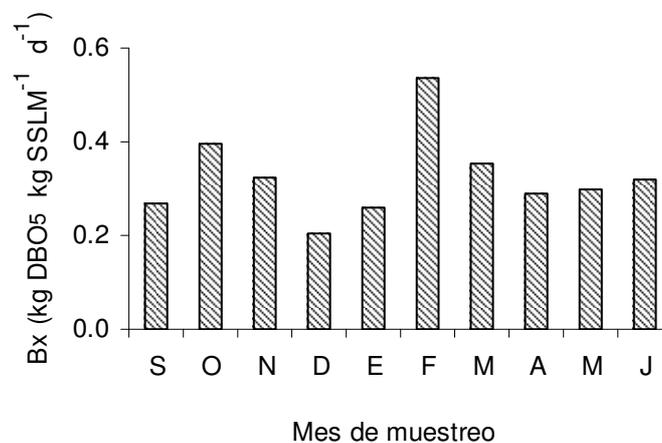


Figura 13 Variaciones estimadas en la carga orgánica

Los datos de DBO₅ corresponden a los días en que se tomaron las muestras (Figura 14) Los porcentajes de remoción de la DBO fueron altos, ubicándose alrededor del 97%, con excepción del mes de noviembre donde se registró el porcentaje de remoción más bajo con 94%.

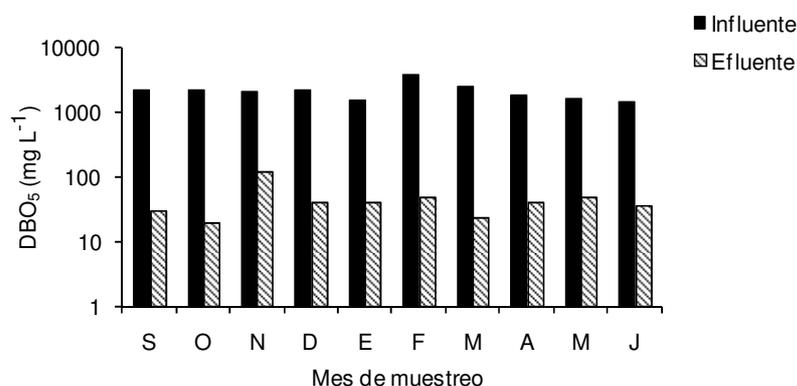


Figura 14 DBO₅ medida en el influente y el efluente

Los datos correspondientes a nitrógeno total tanto en el influente como en el efluente se muestran en la Figura 15. El contenido de nitrógeno mostró variaciones importantes a lo largo del periodo de estudio, la mayoría de los valores se encontraron alrededor de los 50 mg L⁻¹, el valor más alto se registró en el mes de noviembre y se debió a un derrame accidental de amoniaco hacia el sistema de tratamiento. Los valores más altos medidos en el efluente se encuentran en los meses de noviembre, marzo y mayo.

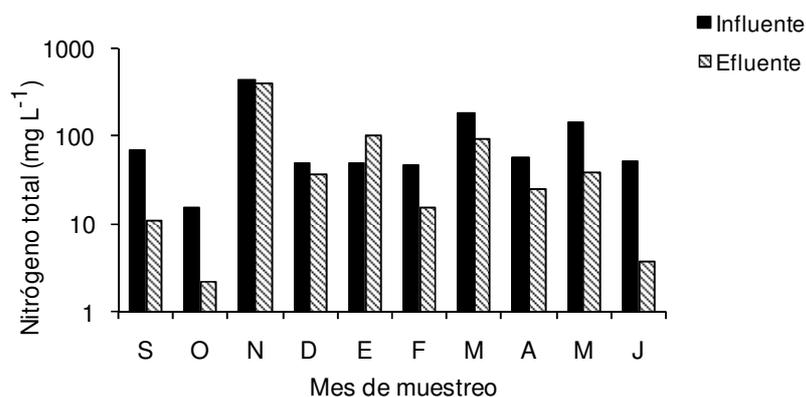


Figura 15 Nitrógeno total medido en el influente y el efluente

La concentración de fósforo total mostró oscilaciones menos pronunciadas que en el caso del nitrógeno total (Figura 16). Los valores medidos en el influente de mantuvieron generalmente en el intervalo de 20–45 mg L⁻¹ las concentraciones más altas se registraron en los primeros meses del estudio. En el caso del fósforo total medido en el efluente, las concentraciones se encontraron en el intervalo de 5-25 mg L⁻¹ en la mayoría de las observaciones.

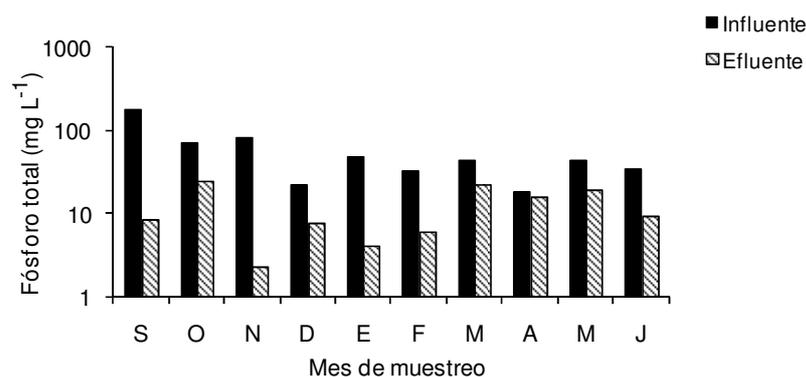


Figura 16 Concentración de fósforo medida en el influente y el efluente

6.2 Planta de Tratamiento Club Náutico Avándaro

Los datos para la planta de tratamiento del Club Náutico Avándaro fueron obtenidos durante el periodo septiembre 2005–junio 2006. En esta planta de tratamiento, al igual que en la planta industrial, se registraron cambios en la cantidad de células observadas con el método FISH, entre las muestras tomadas antes del ingreso de sustratos y las muestras tomadas después del ingreso de los mismos al sistema. A pesar de esto los cambios en la proporción de células hibridadas entre ambas muestras y a lo largo del periodo de estudio, no son explicados por las variaciones observadas en la carga orgánica, de manera semejante a lo ocurrido en la planta industrial. Contrario a lo que se observó en la planta industrial, el análisis de regresión múltiple no mostró ningún tipo de correlación entre las variaciones en la cantidad de células totales ni de células hibridadas con las variaciones de los sólidos totales presentes en el sistema. Las variaciones en las proporciones de los grupos estudiados no pudieron ser explicadas por las variables consideradas en el análisis de regresión.

Los datos de los sólidos totales del licor mezclado se muestran en la Figura 17. Se registraron variaciones importantes en el contenido de sólidos para las muestras tomadas antes y después de la actividad en el club, particularmente en los meses de septiembre, enero, febrero y junio.

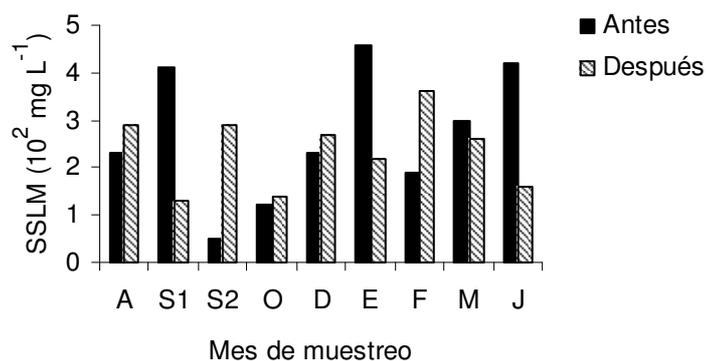


Figura 17 Sólidos totales durante el periodo de estudio en relación a la actividad en el club. S1= muestreo a principio de septiembre, S2= muestreo a finales de septiembre

Los números de células totales estimados a través del conteo con la tinción DAPI, así como los números totales de células hibridadas, se muestran en la Figura 18. Las diferencias en la concentración de células totales entre las muestras no se explican por las variaciones observadas en el contenido de sólidos, al contrario de lo ocurrido en la planta industrial. El número total de células hibridadas en general no mostró diferencias importantes en las muestras antes y después de la actividad en el club, las excepciones más notables se observaron en los meses de septiembre y enero. Las diferencias observadas entre los meses de muestreo no son explicadas por las variaciones en la cantidad de células totales, contrario a lo ocurrido en la planta industrial.

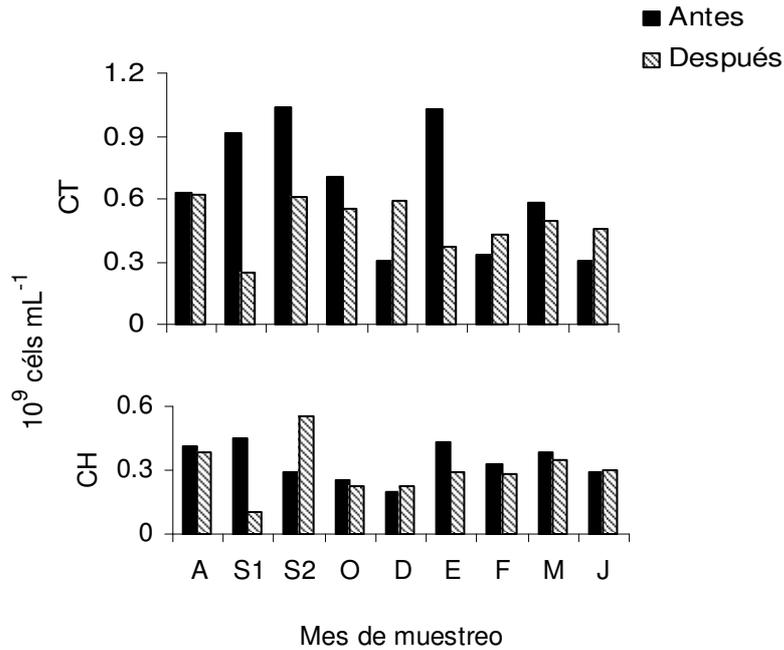


Figura 18 Números de células totales y células hibridadas en las muestras en relación a la actividad en el club. S1= muestreo a principio de septiembre, S2= muestreo a finales de septiembre

La relación entre el número total de células en las muestras y el número de células hibridadas se muestra en la Figura 19 como porcentaje. Las diferencias en los porcentajes entre las muestras antes y después de la actividad en el club se deben principalmente a las diferencias observadas en el número total de células en las muestras.

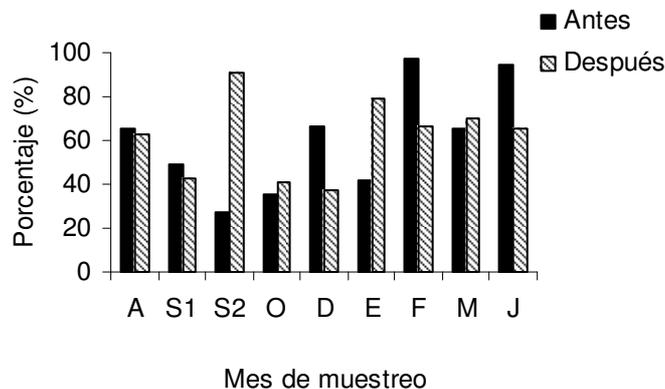


Figura 19 Porcentajes de hibridación para las muestras en relación a la actividad en el club. S1= muestreo a principio de septiembre, S2= muestreo a finales de septiembre

La estructura de la comunidad microbiana conforme a los resultados obtenidos por la técnica de hibridación *in situ*, se muestran en la Figura 20 para la muestra tomada antes de la actividad y para la muestra después de la misma en el club. Los porcentajes aquí presentados son porcentajes relativos al número de células hibridadas en las muestras.

En esta planta de tratamiento, al igual que en la planta industrial, se registraron numerosos cambios en las proporciones de bacterias observadas por el método FISH para cada uno de los grupos estudiados, no solamente entre las muestras tomadas antes y después de la actividad y por tanto del ingreso de agua al reactor biológico, sino también a lo largo del periodo de estudio. De igual manera que con la planta industrial el análisis de los diferentes grupos estudiados mostró cambios en el contenido ribosomal de los diferentes grupos que componen la estructura de la comunidad. Sin embargo, los cambios observados no están relacionados con la carga orgánica.

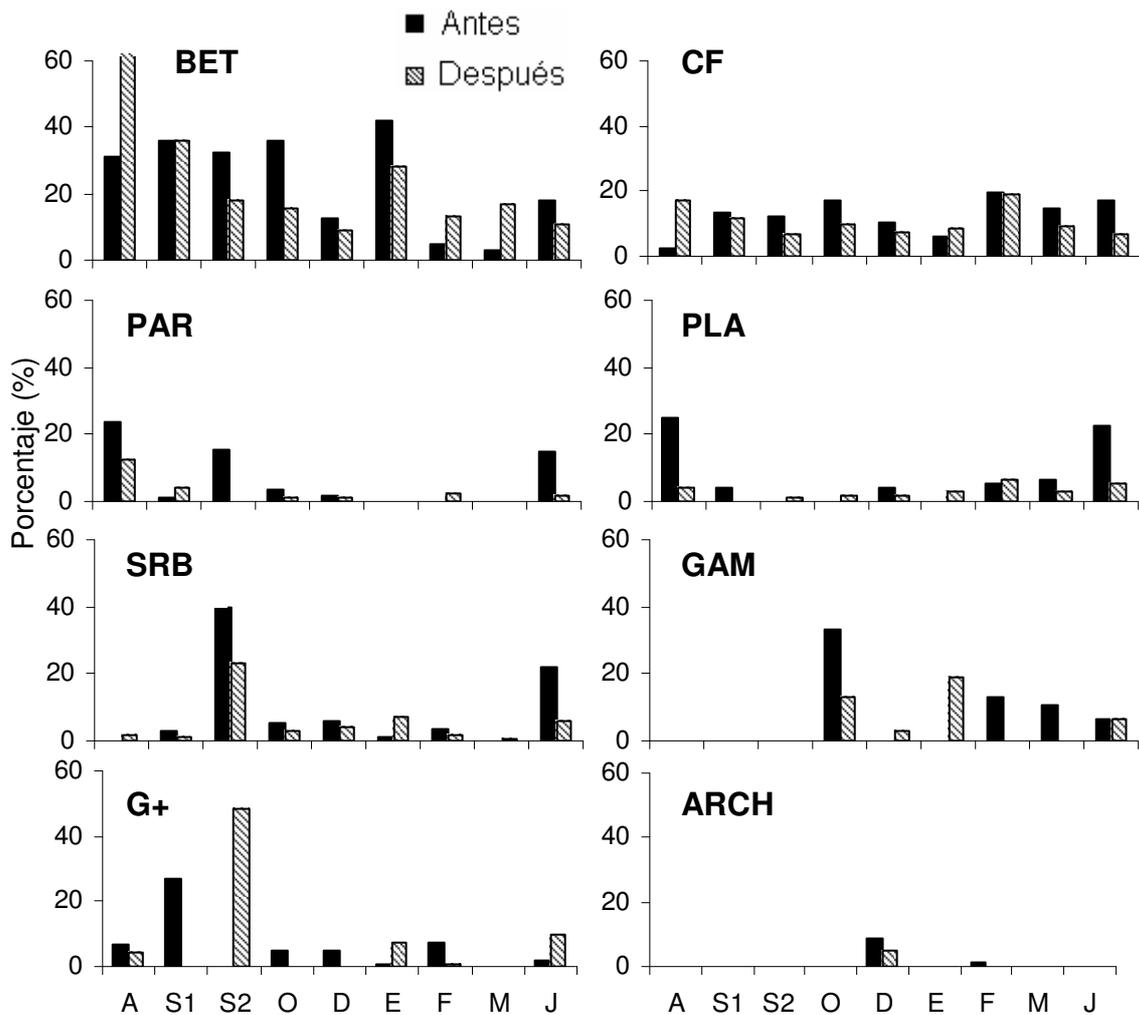


Figura 20 Composición de las muestras tomadas antes y después de la actividad en el club. S1= muestreo a principio de septiembre, S2= muestreo a finales de septiembre

La respuesta de los grupos hacia la entrada de sustratos fue variable, al igual que con la planta industrial debe considerarse que las pruebas de oligonucleótidos utilizadas son para grupos a nivel de *phylum* principalmente, y que existe la posibilidad de que la estructura de la comunidad se componga de numerosas especies. Los grupos que se pudieron determinar con mayor frecuencia y en mayor proporción fueron Betaproteobacteria y Bacteroidetes, al igual que con la planta en la empresa Cognis-Henkel.

Los datos estimados para la carga orgánica (B_x) en la que fueron tomadas las muestras después del ingreso de agua residual al reactor biológico se muestran en la Figura 21, como promedios por muestreo. De manera semejante a lo ocurrido en la planta industrial, las variaciones que se encontraron en la carga orgánica del sistema no tuvieron efecto aparente en la proporción de células hibridadas en la muestra, ni en los cambios observados en las proporciones de los grupos estudiados.

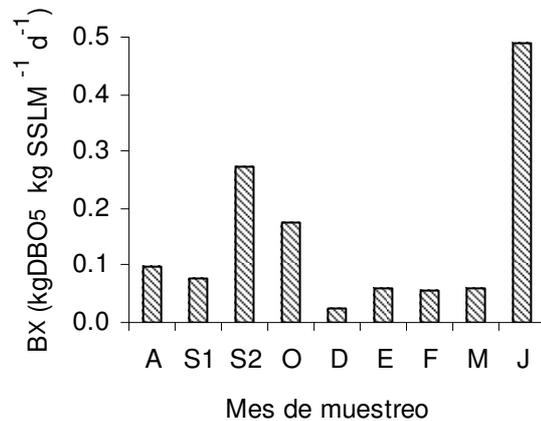


Figura 21 Carga orgánica estimada. S1= muestreo a principio de septiembre, S2= muestreo a finales de septiembre

Los datos de DBO_5 corresponden a los días en que se tomaron las muestras (Figura 22). En general para las muestras tomadas después de la actividad se observó un incremento en la concentración de la DBO_5 , los valores para ambas muestras son en general menores a 20 mg L^{-1} , asumiendo un valor de DBO_5 en el influente de aproximadamente 100 mg L^{-1} , se tendrían valores de remoción de 80 %, lo que se encuentra dentro del intervalo calculado para un sistema de aireación extendida. Las diferencias más notables son los meses de diciembre y junio.

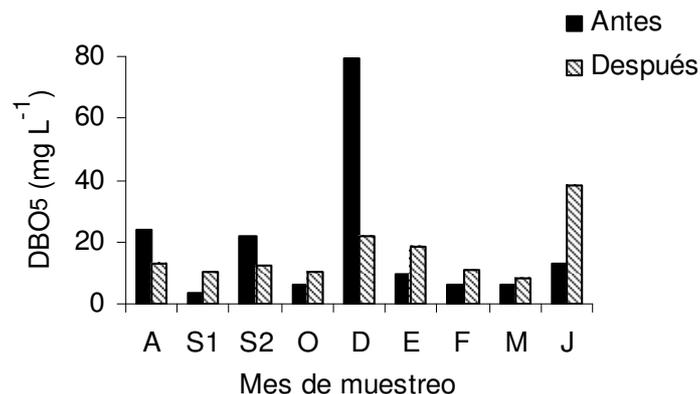


Figura 22 DBO_5 medida en el efluente en relación a la actividad en el club. S1= muestreo a principio de septiembre, S2= muestreo a finales de septiembre

El comportamiento respecto del nitrógeno amoniacal en el efluente se muestra en la Figura 23, donde se aprecian variaciones importantes en la concentración de N-NH_4^+ medido durante el periodo de estudio, no solamente para las muestras tomadas antes de la actividad en el club sino también para las muestras tomadas después de ésta.

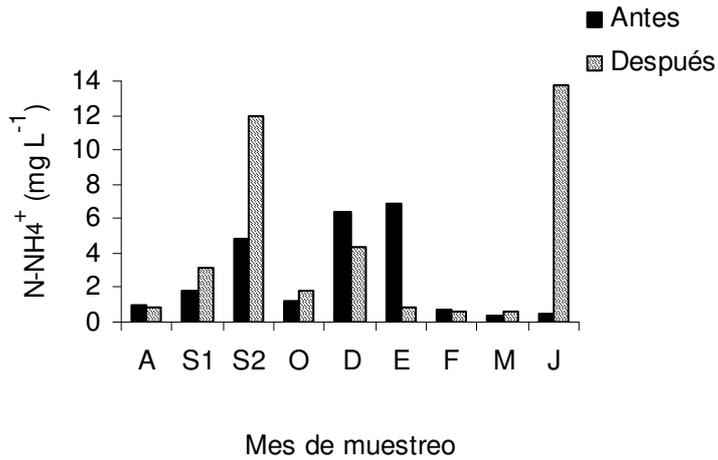


Figura 23 Concentración de nitrógeno amoniacal en el efluente para las muestra antes y después de la actividad en el club. S1= muestreo a principio de septiembre, S2= muestreo a finales de septiembre

Las mayores concentraciones de $N-NH_4^+$ se encontraron en los meses de septiembre y en junio únicamente en la muestra tomada después de la actividad.

En el caso del nitrógeno de nitritos (Figura 24) se observó un aumento en la concentración para las muestras tomadas después de la actividad en el club, para las muestras tomadas antes de la actividad la concentración fue menor a 0.1 mg L^{-1} .

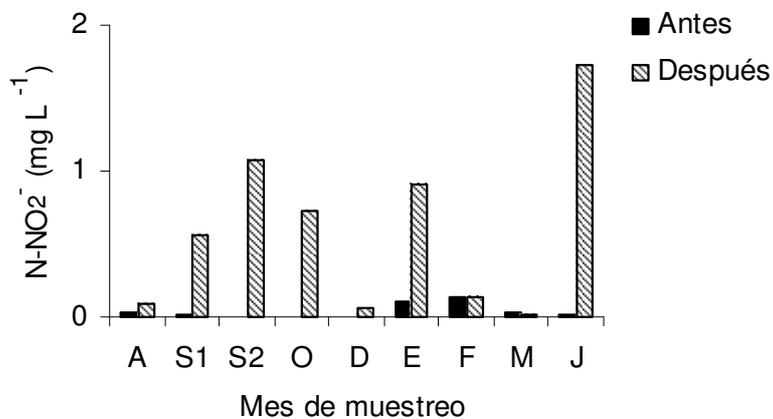


Figura 24 Concentración de nitrógeno de nitritos en el efluente para las muestras antes y después de la actividad. S1= muestreo a principio de septiembre, S2= muestreo a finales de septiembre

En la Figura 25 se muestran las concentraciones medidas en el efluente en cuanto a nitrógeno en forma de nitratos, donde se observa que en general las concentraciones encontradas son mayores para las muestras tomadas después de la actividad en el club.

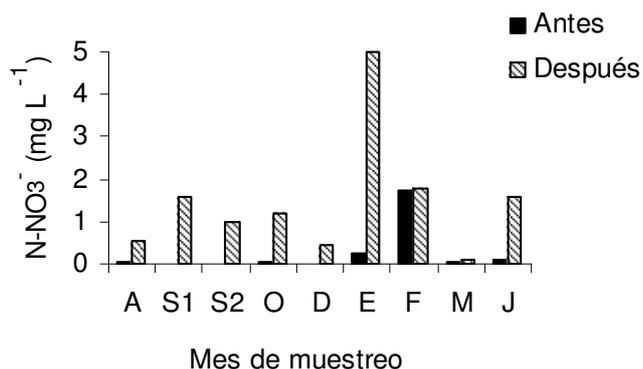


Figura 25 Concentración de nitrógeno de nitratos en el efluente para la muestra antes y después de la actividad en el club. S1= muestreo a principio de septiembre, S2= muestreo a finales de septiembre

En la Figura 26 se encuentran las concentraciones medidas para el contenido de fósforo en el efluente para la muestra tomada antes de la actividad y después de ésta. Se observaron variaciones importantes en el contenido de $P-PO_4^{3-}$ en el efluente a lo largo del periodo de estudio, el contenido medido en general es similar entre las muestras tomadas antes de la actividad como después de la misma, con excepción de los meses de octubre, diciembre y junio donde se observó que el contenido de $P-PO_4^{3-}$ en la muestra tomada después de la actividad fue mucho mayor.

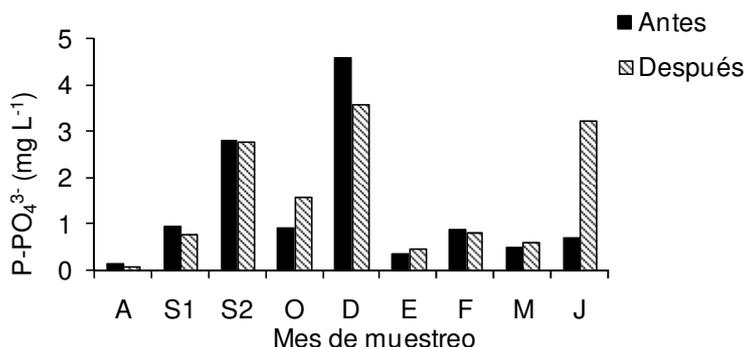


Figura 26 Concentración de fósforo reactivo en el efluente para las muestras antes y después de la actividad en el club. S1= muestreo a principio de septiembre, S2= muestreo a finales de septiembre

Los datos correspondientes al contenido total de nitrógeno en el efluente se muestran en la Figura 27, para las muestras tomadas antes y después de la actividad en el club. Se observó que en general para las muestras tomadas después de la actividad en el club la concentración de nitrógeno total fue mayor. En el segundo muestreo realizado en el mes de septiembre se encontró la concentración más alta. La proporción de nitrógeno orgánico fue en general de 80% del nitrógeno total presente en las muestras tomadas antes de la actividad en el club y de 70% para las muestras tomadas después de la actividad en el mismo.

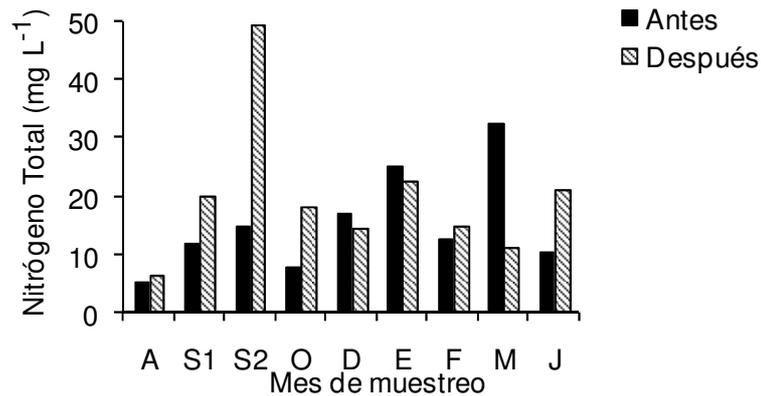


Figura 27 Concentración de nitrógeno total en el efluente para las muestras antes y después de la actividad en el club. S1= muestreo a principio de septiembre, S2= muestreo a finales de septiembre

En la Figura 28 se muestran los datos correspondientes al contenido de fósforo total en el efluente para las muestras tomadas antes y después de la actividad en el club. De manera similar a lo observado con la concentración de nitrógeno total, el segundo muestreo del mes de septiembre fue en el cual se registró la mayor concentración de fósforo en el efluente. La proporción de fósforo no reactivo en las muestras fue de 35 % en promedio. Únicamente en las muestras de agosto y de junio la proporción de fósforo no reactivo fue mayor del 70%.

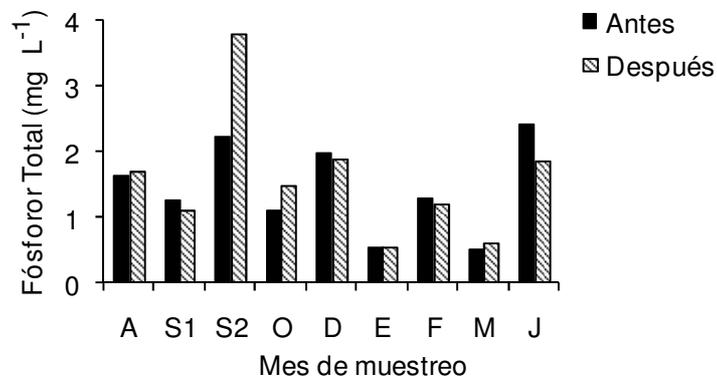


Figura 28 Concentración de fósforo total en el efluente para las muestras antes y después de la actividad en el club. S1= muestreo a principio de septiembre, S2= muestreo a finales de septiembre

7. DISCUSIÓN

7.1 Planta de Tratamiento Cognis–Henkel

Se realizó un análisis de regresión múltiple (GraphPad Prism 4 e InStat 3; Motulsky, 1999) para determinar cuales de las variables consideradas tuvieron un efecto significativo en el comportamiento de los resultados obtenidos.

Los cambios en el contenido de sólidos se encuentran establecidos por las necesidades de operación de la planta de tratamiento ya que la cantidad de sólidos totales en el reactor se establece de tal forma que exista una cantidad suficiente para la degradación de sustratos. Es necesario mencionar también el efecto de dilución que se genera en el sistema, al pasar de la fase en la cual la biomasa se encuentra sedimentada y posteriormente en la fase de llenado del reactor con el ingreso de agua residual y ocurre la mezcla, en la cual la biomasa se encuentra homogenizada, por lo que el comportamiento observado en la concentración de células totales y de sólidos totales son menores en las muestras obtenidas durante la fase de mezcla.

El número total de células estuvo determinado principalmente por el contenido de sólidos totales presentes al momento de que se tomaron las muestras, por lo que las variaciones observadas en el número total de células, tanto dentro de un mismo día de muestreo como a lo largo del estudio, se debieron principalmente a las variaciones que a su vez se encontraron en el contenido de sólidos totales, observación similar a lo encontrado en otros reactores de membranas (van der Gast *et al.*, 2006). En la Figura 27 se muestra la correlación entre el contenido de sólidos totales y la concentración de células totales para las muestras antes y después del ingreso de agua residual al reactor biológico. La correlación fue más significativa en el caso de las muestras tomadas antes del ingreso de agua al reactor ($p=0.0004$), que en el caso de las muestras tomadas después del ingreso de la misma al reactor ($p=0.014$).

El comportamiento general del número total de células hibridadas, determinado con la técnica de hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH), es similar al de las células totales presentes, determinadas empleando la técnica de tinción con DAPI. Las células hibridadas totales estuvieron relacionadas con el contenido de sólidos totales de las muestras. Para la muestra antes de ingreso de agua residual al reactor sólo se encontró una correlación directamente proporcional al contenido de sólidos totales Figura 28.

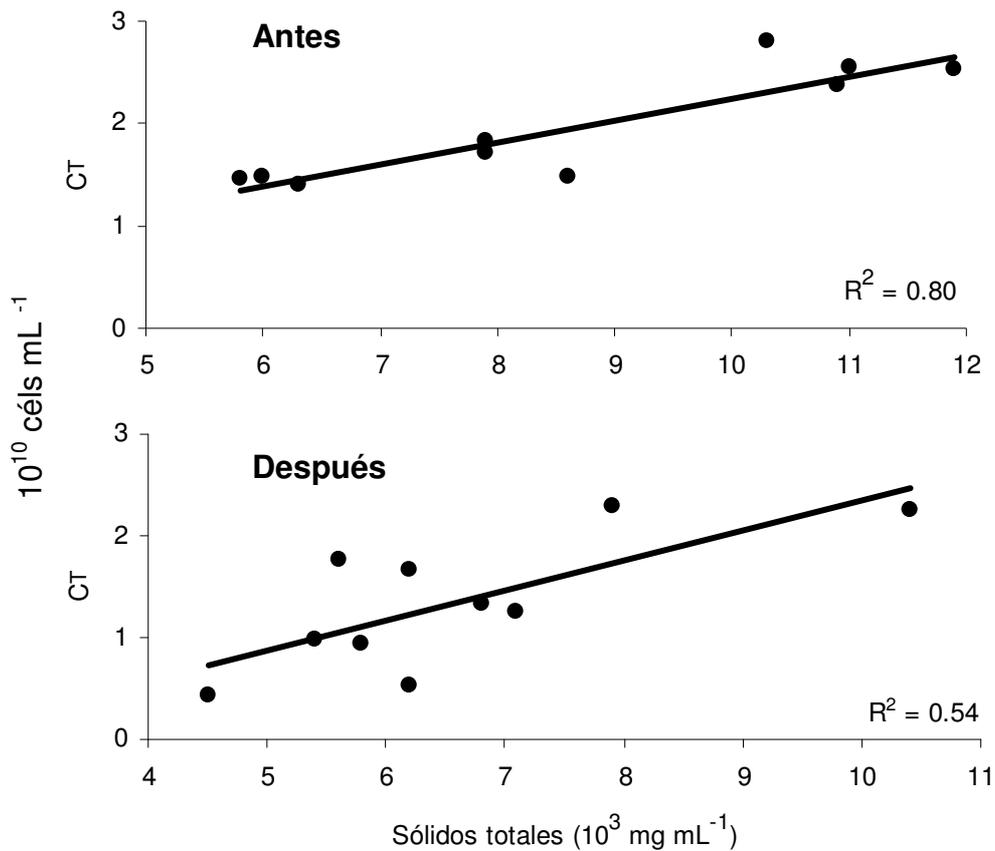


Figura 27 Correlación directamente proporcional entre el contenido de sólidos totales y los números de células totales para las muestras en relación al ingreso de agua residual al reactor biológico

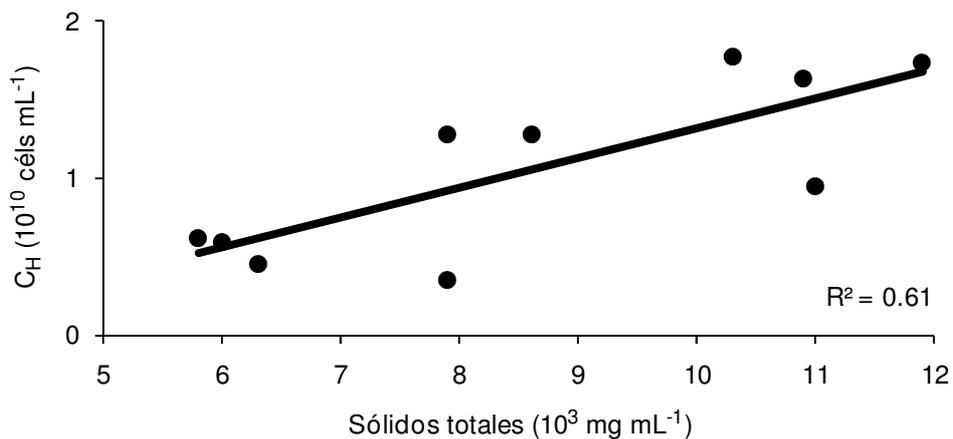


Figura 28 Correlación directamente proporcional entre contenido de sólidos totales y los números de células hibridadas en la muestra antes del ingreso de agua al reactor

Para la muestra después del ingreso del agua al reactor la correlación no solamente fue con el contenido de sólidos sino también con la proporción nitrógeno/fósforo en el agua de alimentación Figura 29. El análisis de regresión múltiple mostró que, en conjunto el contenido de sólidos totales y la proporción

nitrógeno/fósforo (N/P) explican el 84 % de las variaciones observadas en la concentración de células hibridadas a lo largo del periodo de estudio ($p= 0.003$), pero la mayor parte de las variaciones observadas se explican principalmente por el contenido de sólidos totales.

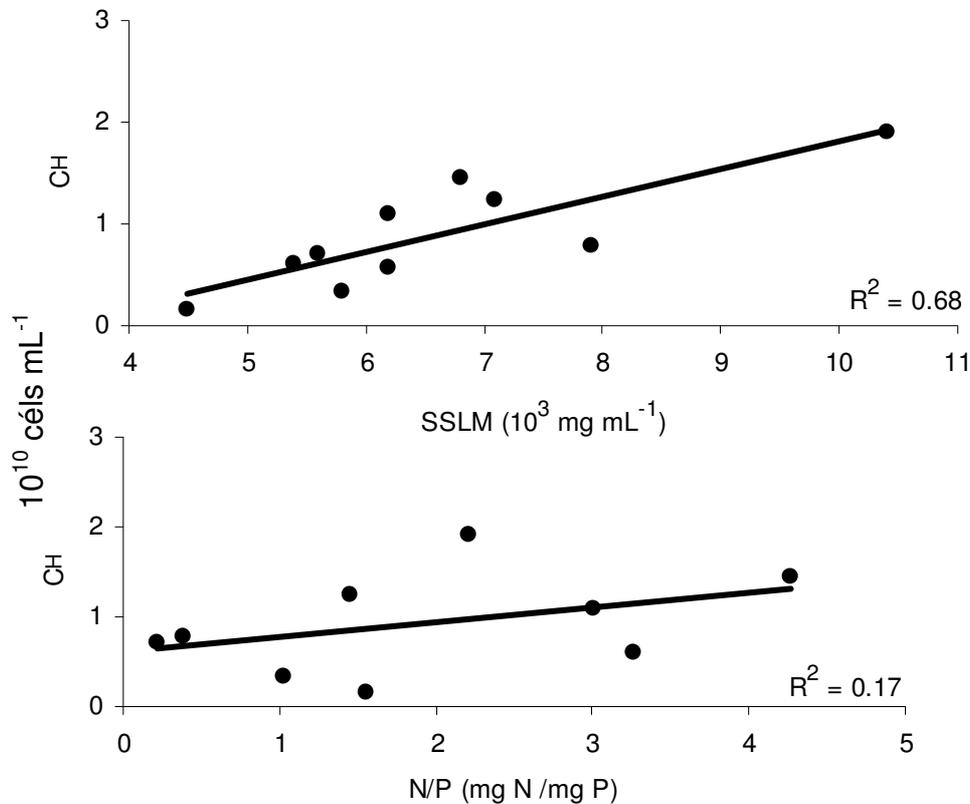


Figura 29 Relación directamente proporcional entre la concentración de sólidos totales y la proporción nitrógeno/fósforo con los números de células hibridadas

Durante el periodo de estudio los porcentajes de hibridación para las muestras obtenidas en la fase sedimentada se encontraron entre 19–86%, y durante la fase mezclada se encontraron entre 35–99%, este último intervalo comparable a lo encontrado en otros sistemas convencionales de lodos activados (Eschenhagen *et al.*, 2003) sin embargo, en otros estudios en los que también se han utilizado bioreactores con membrana para la separación de sólidos, los valores en el porcentaje de hibridación total se encuentran entre 40–50% (Rosenberg *et al.*, 2000).

Se ha sugerido que estas diferencias en el porcentaje total de hibridación podrían deberse a varios factores. En primer lugar se encuentra la gran cantidad de sólidos suspendidos en los bioreactores (los valores típicos en reactores que usan membranas varían de 10–25 g L^{-1}), además de que las edades altas de lodo (la edad del lodo en la planta Cognis–Henkel es de 20 días) provocarían que las bacterias se encuentren en condiciones de extrema competencia por los sustratos entrantes, lo que en consecuencia significaría que los sustratos entrantes sólo son oxidados y usados en el mantenimiento de la célula mas no en la reproducción de la misma, provocando por tanto, niveles bajos de ARNr (Rosenberg *et al.*, 2000). Desde un

punto de vista ecológico los reactores de membrana imponen una severa limitación de nutrientes a la biomasa, lo cual causaría igualmente niveles bajos de ARNr y por tanto las respuestas de los organismos a posibles pulsos de nutrientes serían lentas (Ryoyu y LaPara, 2006). Por otra parte una gran cantidad de sólidos suspendidos provocaría una disminución en la transferencia de oxígeno y esto traería como consecuencia una disminución en el consumo de los sustratos (Rosenberg *et al.*, 2000).

En el caso de la planta de tratamiento en la empresa Cognis-Henkel las observaciones mostraron que hubo una correlación directamente proporcional entre el contenido de sólidos totales y la concentración de células hibridadas, es posible que en este caso en particular no existan condiciones extremas de competencia de sustratos, ya que las concentraciones de sólidos totales no exceden de 10 g L^{-1} en los casos extremos registrados en este estudio, en el presente trabajo el contenido de sólidos suspendidos se encontró alrededor de $6\text{--}7 \text{ g L}^{-1}$ en la mayoría de los muestreos realizados y estos valores son inferiores a las concentraciones de biomasa encontradas en los estudios mencionados por Rosenberg *et al.*, 2000.

Por otra parte, se mostró la existencia de una correlación directamente proporcional con la proporción nitrógeno/fósforo del sistema y los números de células hibridadas, por lo que en el caso de la planta Cognis-Henkel, los aumentos en la concentración de fósforo y/o disminuciones en la concentración de nitrógeno afectan igualmente los porcentajes de células que responden a la hibridación y por tanto el contenido de ARNr de las células, mostrando más bien una limitación en la actividad metabólica por la disponibilidad de nutrientes, posiblemente el nitrógeno.

Otra posibilidad, que podría explicar los cambios en los porcentajes totales de hibridación observados en este trabajo, sería la degradabilidad de los sustratos que entraron al sistema de tratamiento, sin embargo la información disponible (Anexo 1) sobre los productos que se fabrican en la empresa y sobre su presencia en el agua residual no permiten realizar una explicación que considere adecuadamente éste punto sin embargo, sería interesante constatar el efecto del ingreso de un determinado tipo de sustrato tanto en la actividad enzimática así como en las tasas específicas de consumo de oxígeno (Rosenberg *et al.*, 2000), lo que permitiría estudiar la manera en que son utilizados por las bacterias dentro del sistema.

A este respecto es oportuno mencionar que en la biodegradación de surfactantes la conformación de la molécula es muy importante y que en los procesos de fabricación es muy posible la existencia de isómeros cuya degradabilidad puede cambiar dependiendo de varios factores. A pesar de la variedad de surfactantes que podrían entrar al sistema de tratamiento y las diferentes eficiencias en su degradación por los microorganismos (Swisher, 1987) la aclimatación de la comunidad microbiana a tales sustratos es determinante para la degradación (Carvalho *et al.*, 2003), si bien es cierto que las enzimas encargadas de la degradación de sustratos rápidamente utilizables están presentes en concentraciones efectivas en todo momento, la entrada de un nuevo compuesto daría como resultado un cambio en la síntesis hacia las enzimas apropiadas lo que puede ocurrir en el intervalo de horas o hasta días.

Un cambio en el tipo de sustratos que ingresan al sistema puede conducir a un cambio en la estructura de la comunidad, en el cual la proporción de especies capaces de usar el compuesto aumentan en proporción. El cambio en la comunidad podría originarse de diferentes formas, ya sea que la minoría de los organismos

presentes se vuelva dominante, que nuevas especies que ingresen al sistema tengan éxito en el uso de los recursos, o que se generen nuevas cepas originadas por intercambio de plásmidos (Swisher, 1987).

Como se mencionó anteriormente, es difícil establecer la posible ocurrencia de tales cambios basados en el tipo de sustratos disponibles, no solamente por la falta de información al respecto de la producción y posible ingreso de los diferentes tipos de compuestos fabricados en la industria, también por el proceso mismo de tratamiento del agua, ya que es necesario considerar que el agua residual generada llega primero a un tanque donde existe aireación, donde ocurre una dilución y homogenización de sustratos, por lo que el agua de alimentación hacia el reactor biológico puede tener una mezcla de muchos sustratos. Por ello existe la posibilidad de diferentes fenómenos de cometabolismo, lo que complica aun más la interpretación de los datos sobre los organismos presentes y las proporciones en las que pudieron determinarse con la técnica FISH.

La posibilidad de que las variaciones en el porcentaje de células hibridadas, tuvieran efecto en la eficiencia en la degradación de la DBO₅ no pudo establecerse. A pesar de las variaciones observadas en el porcentaje total de células hibridadas los resultados en los análisis de DBO₅ mostraron que el desempeño en cuanto a su degradación fue bastante estable pues en la mayoría de las fechas de muestreo se observó que los valores estuvieron alrededor de 40 mg L⁻¹, únicamente en una ocasión en el mes de noviembre éste parámetro mostró valores alrededor de los 120 mg L⁻¹, lo que ocurrió a pesar de que el porcentaje total de células hibridadas fuera alto y de que no hubiera diferencias importantes en el contenido de sólidos totales con respecto a otros eventos registrados durante el periodo de estudio, la posible deficiencia en la remoción de DBO₅ podría deberse a una intoxicación por altas concentraciones de amonio, debidas a un derrame accidental del mismo en la fecha de muestreo.

En cuanto a la composición de las muestras, en tanto a los grupos microbianos estudiados y de acuerdo con los datos obtenidos por medio de la técnica FISH, se registraron cambios entre las muestras obtenidas en una misma fecha pero en diferente fase de operación de la planta, y también a lo largo del periodo de estudio. Los cambios observados son importantes para los grupos Betaproteobacteria y Bacteroidetes, que fueron los grupos que en mayor proporción y con más frecuencia se determinaron. Las variaciones en las proporciones para los demás grupos se dieron con menor frecuencia y no fueron de la magnitud observada para los dos grupos más importantes. Las variaciones en las proporciones en que se encontraron los organismos estudiados no pudieron ser explicadas por las variaciones observadas en la carga orgánica del sistema, ni por otras variables consideradas en el estudio como contenido de nitrógeno y fósforo en el sistema.

En general las diferencias observadas en la estructura de la comunidad indican que en las muestras en las que existió el ingreso de agua para ser tratada, se pudo determinar a más grupos bacterianos y en algunos de los casos en forma más abundante. La predominancia de Betaproteobacteria observada en la mayoría de las muestras analizadas, concuerda con los resultados de estudios realizados previamente en lodos activados (Wagner *et al.*, 2002; Eschenhagen *et al.*, 2003; Onuki *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 2004; Rosenberg *et al.*, 2000), la predominancia de éste grupo en la mayoría de los casos es del 50% del total de bacterias que pueden ser determinadas con diferentes métodos moleculares pero existen algunas excepciones, siendo Planctomycetes, Chloroflexi, Bacteroidetes y Actinobacteria

(Gram-positivas con alto contenido de Guanina y Citosina en el ADN) algunos de los grupos encontrados como abundantes en otros estudios. En el presente trabajo se encontró en algunas ocasiones que miembros de Bacteroidetes, fueron más importantes en abundancia de lo que fue Betaproteobacteria.

A pesar de que los porcentajes totales de hibridación mostraron variaciones importantes, la cantidad de organismos que sólo hibridaron positivamente a la sonda general EUB 338, pero que no pudieron ser asignados a ningún grupo fue muy alta, con excepción del mes de junio, cabe mencionar que dentro de ésta categoría de organismos no identificados pueden existir diferentes grupos que no fueron considerados en este estudio pero de los que existen diferentes sondas ARNr para su determinación en muestras naturales. Entre éstos grupos se encuentran Verrucomicrobia, Chlorobi, Chloroflexi, Firmicutes, Fibrobacteres y Actinobacteria, entre los más importantes (Wagner *et al.*, 2002; Björnsson *et al.*, 2002).

Considerando datos de otros trabajos (Wagner *et al.*, 2002) en los que se reporta la incidencia de éstos grupos es posible que se encuentren presentes en el sistema. Por otra parte, para el grupo Alfaproteobacteria sólo se utilizó una sonda específica para un género (*Paracoccus*) por lo que sin duda podría haber más organismos presentes pertenecientes Alfaproteobacteria en la biocenosis, además se han encontrado otros organismos que no responden positivamente a la hibridación con otras sondas (Siyambalapitiya y Blackall, 2005) y que resultaban por tanto, ignorados en los análisis usando la técnica FISH con las pruebas de oligonucleótidos convencionales.

En algunos estudios mencionados anteriormente al realizar análisis posteriores de los grupos identificados inicialmente se ha logrado determinar a los integrantes a nivel de género o de especie, los resultados son variados, encontrando desde dominancia de dos especies para un grupo determinado hasta la coexistencia de cinco diferentes especies dentro de un mismo grupo igualmente, por lo que resulta difícil realizar una aproximación hacia los posibles géneros y/o especies que podrían estar incluidas en los grupos determinados en este estudio, considerando que la función de los organismos en el tratamiento del agua residual no puede encasillarse en un sólo grupo filogenético (Anexo 2).

Los cambios en la composición de la comunidad durante el periodo de investigación podrían estar relacionados a variaciones en factores fisicoquímicos como la temperatura del agua y el pH, parámetros no considerados en este trabajo y cuyo efecto en la estructura de la comunidad es por tanto ignorado, pero cuya importancia ha sido demostrada en otras investigaciones (Eschenhagen *et al.*, 2003; Egli *et al.*, 2003; Miki y Yamamura, 2004; Stasinakis, *et al.*, 2003). Por ejemplo, estudios realizados sobre organismos responsables de la nitrificación (Egli *et al.*, 2003) mostraron que a un pH 7.5 y temperatura de 30 °C las comunidades pueden ser semejantes, pero que cambios en el pH (fuera del intervalo pH 7–7.5) afectan de forma muy importante a las comunidades oxidadoras de amonio causando el cese total de la actividad, por otra parte la disminución en el pH provoca también cambios transitorios en la composición de la biocenosis, pero si el cambio en pH es mayor los cambios observados son irreversibles (Prinčič *et al.*, 1998).

También se ha observado que la concentración de amonio libre (cuya proporción en la forma ionizada y no ionizada, así como la toxicidad, depende del pH) es importante en la inhibición de la actividad de los oxidadores de nitrito a más de 4mg L⁻¹, y que hay organismos como *Nitrosomonas* y *Nitrosococcus* que tienen

mayor actividad en la oxidación de amonio cuando la concentración de éste es alta, y por el contrario *Nitrospira*, *Nitrosovibrio* y *Nitrosolobus* tienen mayor actividad cuando la concentración de amonio es baja (Aoi *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2004). A este respecto si se han producido cambios en la estructura de la comunidad debidos a una concentración de amonio alta, los cambios pueden revertirse al regresar la concentración de amonio a los niveles originales (Prinčič *et al.*, 1998).

En cuanto a los organismos oxidadores de nitrito se ha observado que la competencia, en particular entre *Nitrobacter* (Alfaproteobacteria) y *Nitrospira*, se ve afectada por las concentraciones de nitrito, se ha concluido que cuando existen perturbaciones en las concentraciones de nitrito se estimula el crecimiento de organismos pertenecientes a *Nitrobacter* al inducir aumentos en la concentración de nitrito, y que el comportamiento no puede ser revertido al regresar a las condiciones originales (Nogueira y Melo, 2006). Se ha observado también que en la presencia de una importante cantidad de carbono orgánico los nitrificadores se ven superados por los organismos heterótrofos por las diferencias en las tasas de crecimiento además de que pueden ser capaces de realizar la mineralización de diferentes compuestos orgánicos de alto y bajo peso molecular (Kindaichi *et al.*, 2004; Ballinger *et al.*, 2001; Martinage y Paul, 2000).

El efecto de la temperatura sobre la actividad de los organismos es de suma importancia por ejemplo, influye en la tasa de crecimiento ya que a una temperatura de 30–35°C las bacterias oxidadoras de amonio tienen tasas de crecimiento más altas que bacterias oxidadoras de nitrito (Wyffels *et al.*, 2004), lo que concuerda con observaciones realizadas de que a temperaturas bajas se favoreció el desarrollo de los oxidadores de nitrito (Aoi *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2004). Aunque en otros casos el efecto de las diferencias de temperatura en el crecimiento no es tan claro (Lishman *et al.*, 2000; Martinage y Paul, 2000), pues algunas poblaciones pueden necesitar diferencias de más de 6°C para manifestar un cambio en su actividad, particularmente en la eficiencia del uso de los recursos (Y).

De igual importancia es la presencia de protistas en los sistemas, ya que su presencia o ausencia asociada a las condiciones óxicas o anaerobias del lodo activado tienen influencia importante en la depredación (Martinage y Paul, 2000), aspecto que tampoco se incluyó en esta investigación.

La estructura de los agregados microbianos también es de importancia en cuanto a los tipos de organismos presentes y su papel en los procesos que ocurren en el lodo activado (Jang *et al.*, 2003), debido a la potencial existencia de condiciones (aerobias, anóxicas y anaerobias) al interior de los agregados que favorecen el desarrollo de grupos particulares de organismos (Schramm *et al.*, 1999; Wilén *et al.*, 2004), lo que bien podría ocurrir en los agregados de la planta de tratamiento estudiada ya que en todo momento se observaron de forma redondeada y compacta, un aspecto que no se consideró y que ayudaría a establecer la distribución espacial de los organismos dominantes en los flóculos.

Por lo tanto los resultados obtenidos con la técnica FISH en el presente trabajo en el que se observan diferencias en los grupos bacterianos observados, podrían deberse a un conjunto de factores de los cuales los mencionados anteriormente son los que se consideran de mayor importancia. Es difícil profundizar en el efecto de estos factores en la comunidad microbiana debido principalmente a que no se realizó el monitoreo de las variables como pH, temperatura, depredación por protozoos, además de que en el análisis del contenido de nitrógeno no se

consideran especies químicas, por otra parte el estudio de la existencia de micronichos hacia el interior de los agregados microbianos sólo es posible con técnicas muy sofisticadas. Por otra parte sería necesario considerar que el empleo de sondas ARN a nivel filogenético de clase podrían no proporcionar información suficiente al respecto de la dinámica de la comunidad.

Es necesario tener en cuenta al analizar la estructura de la comunidad microbiana, que el empleo de diferentes técnicas moleculares puede originar resultados diferentes no solamente en cuanto a la cantidad de grupos microbianos determinados, sino también en la proporción en la que éstos se encuentran en los sistemas (Eschenhagen *et al.*, 2003). No obstante las dificultades existentes en la aplicación de métodos moleculares para la determinación de los diferentes organismos presentes en un sistema determinado, es necesario generar información más detallada para poder explicar el desempeño del lodo activado y poder relacionar a la comunidad presente con los datos observados en los análisis tradicionales que se emplean para monitorear el desempeño de los sistemas de tratamiento, ya que a nivel de grupos la información no parece ser la adecuada, el empleo de técnicas como PCR – DGGE, en combinación con FISH resultaría conveniente para monitorear a la comunidad a un nivel más explicativo (Onuki *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 2002), aun cuando no siempre se puede relacionar la información obtenida con métodos muy finos sobre los números de bacterias de una especie determinada y las tasas de remoción y/o producción de sustratos (Hall *et al.*, 2003) debe considerarse que se puede complementar la información.

Es importante resaltar la diferencia que existe entre lo que es el crecimiento bacteriano y la actividad metabólica, considerando también que la velocidad a la que ocurre la remoción de nutrientes está en función del metabolismo bacteriano y/o el crecimiento. El metabolismo describe las reacciones anabólicas y catabólicas que son responsables del mantenimiento celular, el crecimiento de la célula, la respiración y el movimiento. El crecimiento es la habilidad de la célula para dividirse y crear nueva biomasa, lo que implica no sólo un incremento en el número de células individuales, también la célula bacteriana incrementa en tamaño hasta duplicarlo y luego ocurre la división, por lo que se hace necesario pensar en cuales condiciones la célula sólo usa la energía para la respiración y en cuales para dividirse.

Los valores en la literatura para la tasa específica máxima de crecimiento (μ_{max}) para diferentes organismos se muestra en la Tabla 5. En estudios en los que se ha determinado las tasas máximas de crecimiento se han registrado diferentes resultados, por ejemplo cuando se utilizó el método de incorporación de timidina, se encontraron tasas de crecimiento de 0.2-0.5 d⁻¹ en compartimentos anaerobio-anóxico y aerobio de los sistemas, con un tiempo de duplicación de 3.9–1.4 días respectivamente (Pollard y Greenfield, 1997), aunque en otro estudio empleando la misma técnica se determinó una tasa de crecimiento para organismos anaerobios de 0.8 d⁻¹ y con tiempos de duplicación de 21.6 horas (Pollard, 2006). Al respecto de las bacterias reductoras de sulfato es necesario mencionar que han sido halladas tanto en zonas aerobias como anaerobias (Manz *et al.*, 1998) por lo que podrían exhibir diferentes tasas de crecimiento. Para las bacterias oxidadoras de amonio la tasa de crecimiento que ha sido calculada es de 0.32 d⁻¹, lo que significa un tiempo de duplicación de 2.16 días (Jang *et al.*, 2005), por otra parte hay que considerar el posible error al realizar las determinaciones en las tasas de crecimiento, los cuales pueden llegar a ser importantes (Vanrolleghem *et al.*, 2004; Katehis *et al.*, 2001).

Tabla 5 Características de los Principales Grupos Funcionales en el Lodo Activado

Tipo de organismo	Donador de electrones	Aceptor de electrones	Fuente de carbono	Y gSSV gDBO ⁻¹	μ_{\max} d ⁻¹
Heterótrofos aerobios	DBO (sacáridos)	O ₂	DBO	0.49	13.2
	otro DBO	O ₂	DBO	0.42	8.4
Desnitrificadores	DBO	NO ₃ ⁻	DBO	0.25	4
	H ₂	NO ₃ ⁻	CO ₂	0.81	1
	S	NO ₃ ⁻	CO ₂	0.15	1
Autótrofos nitrificadores	NH ₄ ⁺	O ₂	CO ₂	0.34	0.92
	NO ₂ ⁻	O ₂	CO ₂	0.08	0.62
Reductores de sulfato	H ₂	SO ₄ ²⁻	CO ₂	0.28	0.29
	DBO acetato	SO ₄ ²⁻	acetato	0.057	0.5

Debido a que los tiempos de duplicación son altos, y a que la diferencia de tiempo entre la toma de una muestra y otra no fue suficiente para alcanzar el tiempo de duplicación de los organismos autótrofos, los cambios observados con la técnica FISH entre las muestras tomadas un mismo día sólo reflejan un cambio en el contenido de ARNr de los organismos heterótrofos, aun cuando éstos cambios fueron mínimos. En otros estudios por ejemplo, usando otras técnicas de estudio (DGGE) en sistemas de tratamiento en plantas SBR (Ottawa *et al.*, 2006), no se detectaron cambios en la composición de la comunidad durante un ciclo de tratamiento pero sí a lo largo del estudio. Lo que se reflejaría en todo caso en los datos de la planta Cognis-Henkel sería en cierta forma la actividad potencial de los organismos presentes, ya sea que no dispusieran de sustrato al momento de la toma de la muestra (como en la muestra sedimentada) o cuando hubiera habido ingreso de sustratos al sistema (en la muestra con biomasa mezclada), debido a que el ARNr se acumula durante los cambios metabólicos (Frigon *et al.*, 2001).

En el caso particular de los nitrificadores, se ha visto que son capaces de retener el contenido ribosomal aun cuando la actividad se ha detenido por la falta de sustrato y es necesario tomar en cuenta que cuando las células no están creciendo en condiciones estacionarias puede haber grandes diferencias entre las tasas de síntesis y las concentraciones reales de ribosomas, consecuentemente las mediciones por hibridación *in situ* de ARNr en células que crecen en un ambiente nutricionalmente cambiante, no se relacionarían directamente a las actividades de crecimiento celular (Molin, 1999).

Funcionalmente la gran cantidad de biomasa es responsable de la remoción de los nutrientes en los sistemas, y no sería por tanto que se contenga a bacterias muy activas en cuanto a crecimiento, ya que hay que considerar que la actividad enzimática puede permanecer alta a pesar de que la tasa de crecimiento sea baja como ocurre en los reactores con retención de biomasa por medio de membranas (Ryuoyu y LaPara, 2006; LaPara *et al.*, 2001), a pesar de lo cual se pueden producir cambios importantes en la comunidad microbiana y aun cuando la composición de los sustratos no tenga variaciones, por lo cual los organismos podrían ser metabólicamente redundantes.

No obstante las diferencias encontradas en la composición de la comunidad de acuerdo a la técnica FISH, entre las muestras de una misma fecha y a lo largo del

estudio, la planta de tratamiento mostró una remoción estable (con más del 95%) en la DBO₅ sin importar los cambios en la estructura de la comunidad, los cambios en la estructura y composición de la población ocurrieron aun durante periodos de operación constantes, lo que concuerda con otros estudios (Rosenberg *et al.*, 2000).

7.2 Planta de Tratamiento Club Náutico Avándaro

Al igual que con los datos obtenidos para la planta de tratamiento de carácter industrial, en la planta de tratamiento del Club Náutico Avándaro en Valle de Bravo se realizó un análisis de regresión múltiple (GraphPad–Prism 4 e InStat 3, Motulsky, 1999) con el objeto de encontrar si las variables medidas tuvieron algún efecto importante en los resultados obtenidos.

El contenido de sólidos totales en la planta mostró variaciones importantes entre las muestras tomadas antes de la actividad y después de ésta a lo largo del estudio. El efecto de dilución en el sistema podría ser importante en las diferencias registradas, por otra parte el manejo de la planta puede tener influencia en la cantidad de sólidos presentes, ya que cuando las bombas usadas para la aireación se taponan se retira un poco de lodo activado para evitar el daño a las mismas. El contenido de sólidos suspendidos en el sistema de tratamiento del club produce la impresión de ser muy bajo ya que operacionalmente se considera que el contenido de sólidos totales en una planta de tratamiento debe encontrarse alrededor de los 3 g L^{-1} , pero la carga orgánica del sistema se encuentra en lo esperado para el diseño de aireación extensiva.

A diferencia de lo observado en la planta de tratamiento de la empresa Cognis-Henkel, en la planta de tratamiento del Club Náutico Avándaro los números de células totales en las muestras no estuvieron correlacionados con la concentración de sólidos totales, ni con ninguno de los otros parámetros considerados en los análisis de regresión.

El comportamiento observado en el número total de células hibridadas con la técnica FISH, es bastante similar al de la concentración de células totales. El análisis de regresión múltiple no mostró ninguna correlación entre los números de células hibridadas con ninguno de las variables consideradas, lo cual contrasta con lo encontrado en la planta industrial.

Por otra parte el porcentaje de células hibridadas para las muestras obtenidas antes de la actividad en el Club se encontró entre 38–91% y para las muestras obtenidas después de la actividad entre el 53–86%, valores que son comparables a otros estudios realizados en lodos activados (Eschenhagen *et al.*, 2003), pero las variaciones observadas entre las muestras antes y después de la actividad en el club así como a lo largo del periodo de estudio no parecen estar relacionadas con ninguna de las variables medidas durante el periodo de investigación.

En cuanto a la composición de muestras se registraron cambios en la proporción de bacterias determinadas con la técnica FISH. Prácticamente en todo el periodo de estudio se observó una gran variación en la composición de las muestras y en la proporción de organismos que pudieron ser determinados con las pruebas de oligonucleótidos utilizadas, en esta planta de tratamiento la estructura de la comunidad fue más dinámica que en la planta industrial, se observaron alternancias en cuanto al grupo que dominó en proporción, por ejemplo, en los primeros meses predominó el grupo Betaproteobacteria, pero a finales de septiembre existió una disminución en la abundancia de células hibridables para éste grupo, y se observó que miembros del grupo Deltaproteobacteria predominaron en la muestra antes de la actividad para el muestreo realizado a finales de septiembre y principio de octubre, y posteriormente se encontró una gran abundancia de bacterias Gram-positivas en la muestra después de la actividad para éste mismo muestreo; casi un mes más tarde

en el muestreo de octubre, el grupo dominante fue Gammaproteobacteria en la muestra antes de la actividad.

En general para esta planta de tratamiento se observó que para las muestras tomadas después de la actividad en el Club se determinó un mayor porcentaje de organismos. En particular los grupos Betaproteobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes y Deltaproteobacteria fueron los que se pudieron determinar en mayor proporción prácticamente a lo largo de todo el periodo de estudio. La dominancia de Betaproteobacteria y miembros de Bacteroidetes en varias de las muestras analizadas, concuerda con estudios realizados en sistemas que también tienen aireación intermitente como parte del diseño en el tratamiento del agua (Ottawa *et al.*, 2006; Wagner *et al.*, 2002) y coinciden con lo observado en la planta industrial

La cantidad de bacterias que no fue posible determinar pero que respondió positivamente a la sonda EUB 338 fue considerable a partir de octubre, entre los probables grupos que podrían encontrarse incluidos entre estas bacterias no determinadas se encuentran Verrucomicrobia, Chlorobi, Chloroflexi, Firmicutes, Fibrobacteres y Actinobacteria, entre los más importantes (Wagner *et al.*, 2002; Björnsson *et al.*, 2002) grupos para los cuales no se dispuso de sondas para realizar la hibridación *in situ*, lo mismo que otros miembros de Alfabroteobacteria diferentes de *Paracoccus*, así como otros organismos descritos recientemente (Siyambalapitiya y Blackall, 2005).

Los datos obtenidos para esta planta de tratamiento, en la cuantificación de los grupos estudiados mediante FISH, reflejan cambios en la composición de la comunidad microbiana del sistema; si bien el tiempo transcurrido entre la toma de las diferentes muestras sería suficiente para que los organismos heterótrofos duplicaran sus poblaciones, no ocurre lo mismo para los organismos autótrofos. Esto considerando que la tasa específica máxima de crecimiento, a pesar de las grandes variaciones observadas en cuanto a su determinación, indican tiempos de duplicación de > 2–4 días aproximadamente. Como se argumentó anteriormente en el apartado para la planta Cognis–Henkel, existen discrepancias sobre la posibilidad de que los cambios observados en el contenido de ARNr estén acoplados o no lo estén al crecimiento.

Si el ambiente en el cual están creciendo las bacterias no es estacionario se ha argumentado que no es posible relacionar directamente el contenido de ARNr con las actividades de crecimiento celular (Molin, 1999), por otra parte Frigon *et al.*, en 2001 mencionan que los niveles de ARNr están relacionados de manera positiva con el crecimiento celular, por lo cual es necesario considerar si los cambios en el contenido de ARNr de los grupos estudiados se hayan acoplados con el crecimiento de la población y por tanto representan el cambio de la comunidad, o sólo representan la diferencia entre aquellos organismos que parecen ser suficientemente activos para ser detectados, ya que los datos obtenidos podrían no reflejar a todos los integrantes de la biocenosis, debido a las limitaciones de la técnica, pues podría haber bacterias que a pesar de no tener un contenido de ARNr suficiente para ser detectadas por medio de FISH (es decir, tener menos de 30 ribosomas en la célula), sí podrían ser capaces de consumir sustratos.

Los cambios en la comunidad determinados por medio de FISH a lo largo del estudio, al igual que aquellos observados en la planta de tratamiento Cognis-Henkel, podrían deberse a diferentes factores fisicoquímicos (Eschenhagen *et al.*, 2003; Egli

et al., 2003; Miki y Yamamura, 2004; Stasinakis, *et al.*, 2003), los cuales se han descrito en el apartado correspondiente a la planta de tratamiento de la empresa Cognis-Henkel.

El establecimiento de una relación entre las variaciones en el porcentaje de células hibridadas ni la composición de las muestras con el desempeño de la planta de tratamiento no fue posible, a pesar de las diferencias en los porcentajes totales de hibridación y de los cambios observados en la composición de la comunidad microbiana de acuerdo a la técnica FISH, las concentraciones determinadas en cuanto a la DBO₅ en el efluente se mantuvieron en general alrededor de los 20 mg L⁻¹.

Además el comportamiento observado del nitrógeno de nitritos en el efluente tampoco se correlacionó con ninguno de los grupos observados, lo mismo ocurrió en cuanto al nitrógeno de nitratos y al fósforo reactivo, no se encontró ningún tipo de correlación con las variables consideradas en el análisis de regresión.

Los cambios observados en la comunidad microbiana durante el año de estudio concuerdan con observaciones realizadas en otros sistemas de tratamiento en los cuales a pesar de existir cambios en la comunidad microbiana fueron estables en cuanto a remoción de DBO₅, lo cual es importante porque muestra que la estabilización en la eficiencia del tratamiento no siempre significa la estabilización de la comunidad bacteriana (Ottawa *et al.*, 2006).

Además de los diferentes factores fisicoquímicos mencionados anteriormente, el comportamiento observado en la comunidad microbiana de la planta de tratamiento del club podría estar relacionado con otros aspectos, por ejemplo se ha observado que en sistemas convencionales de lodos activados que tienen ciclos óxicos y anóxicos, lo cual podría ser el caso de ésta planta, la actividad depredadora de los protozoos podría ser responsable de los cambios observados en el número de los microorganismos estudiados (Martinage y Paul, 2000).

Existe la posibilidad de que los ciclos de aireación utilizados tuvieran un efecto sobre la comunidad microbiana. Sería necesario disponer de datos concretamente sobre las condiciones de óxido-reducción en el sistema de tratamiento no solamente en los días en que se tomaron las muestras sino también entre semana cuando el régimen de aireación es modificado, esto debido a que se ha observado (Manser *et al.*, 2006) que bajo diferentes condiciones de óxido-reducción se tienen diferentes efectos sobre la actividad enzimática de los organismos presentes, particularmente de los organismos autótrofos, lo que podría reflejarse en la composición de la comunidad sobre todo en las muestras tomadas antes de la actividad importante en el Club.

Otro aspecto a considerar es que los cambios observados en los números de bacterias, así como la composición de la comunidad podrían estar relacionados con la inanición, aunque se ha observado que en periodos cortos (2–8 días) solamente se causan cambios mínimos y que la capacidad en la degradación sigue siendo efectiva y semejante al de poblaciones no sometidas a inanición (Konopka *et al.*, 2002).

Puesto que en ninguno de los sistemas de tratamiento estudiados se obtuvo relación de la carga orgánica con la comunidad microbiana es posible decir que a las cargas estudiadas en este trabajo no existe un efecto apreciable, aparentemente sólo si la carga orgánica tiene valores extremadamente altos (20 kg DBO₅ kg SSLM⁻¹

d⁻¹) el efecto sería importante y ventajoso para las bacterias con tasas de crecimiento altas (Stasinakis *et al.*, 2003).

En las plantas de tratamiento estudiadas se observaron cambios en la comunidad a lo largo del periodo de estudio, existen otras posibles causas que explicarían las variaciones observadas. El papel de los virus o fagos en el proceso de lodos activados no está bien documentado, pero es posible que su presencia pueda causar cambios rápidos e importantes en las especies bacterianas dominantes. Dado que hay muchas especies bacterianas que se encuentran siempre presentes, si una especie se encuentra diezmada por el efecto de la depredación o de los fagos, otra especie puede reemplazarla rápidamente de tal forma que perturbaciones significativas en el tratamiento no son detectadas, lo cual es un ejemplo de la redundancia en los sistemas microbianos y posiblemente la razón de que los sistemas de lodos activados funcionen confiablemente (Withey *et al.*, 2005).

Otra posible explicación se encuentra en la teoría de la biogeografía de islas, que propone que el número de especies que se encuentran en una isla (los sistemas de tratamiento pueden ser vistos como islas) está determinado por un balance dinámico entre las tasas de colonización y extinción. Existen exploraciones recientes a este respecto en las cuales ha podido determinarse que sistemas de tratamiento pequeños tienen una diversidad baja y por lo tanto menos estable, por el contrario sistemas de tratamiento grandes mantienen una diversidad más grande y son más estables temporalmente (van der Gast *et al.*, 2005; van der Gast *et al.* 2006).

Hasta ahora se sabe muy poco acerca de los procesos involucrados en la dinámica de los procariontes en los sistemas de tratamiento, por lo que resulta difícil predecir de manera cuantitativa los efectos de los diferentes ambientes en la ecología microbiana del lodo activado. A pesar de los cambios observados en la composición de las comunidades la eficiencia de los tratamientos permanece alta, aparentemente la redundancia metabólica permite que los organismos más capaces de sobrevivir puedan dominar rápidamente conforme las condiciones cambian.

8. CONCLUSIONES

Se ha comprobado una correlación lineal entre los números de bacterias totales presentes (latentes, vivas, y/o muertas) y la concentración de sólidos totales en la planta Cognis-Henkel con la carga bien controlada por el operador. Una correlación similar se ha comprobado analizando los números de células que son detectables con el método FISH (es decir células con cantidad suficiente de ribosomas), para la muestra tomada antes del ingreso de agua residual al sistema de tratamiento, lo que sugiere que cuando no hay sustratos disponibles para la degradación, la proporción de células detectables con el método FISH en los sólidos guarda una proporción constante.

En la planta Cognis-Henkel, los números de células detectables por medio de FISH en la muestra tomada después del ingreso de agua residual se correlacionan con la concentración de sólidos totales en el reactor y la proporción nitrógeno / fósforo en el agua de alimentación, los resultados indican que la variación en la concentración de nitrógeno en el agua de alimentación fue la principal causa de las diferencias encontradas en los números de células detectables por medio de FISH en las muestras analizadas.

La correlación entre la proporción de células hibridadas y la entrada de sustratos al sistema no pudo ser comprobada. En cuanto a los representantes de los grupos bacterianos heterótrofos estudiados no se pudo determinar el papel de los cambios en la carga orgánica en éstos, utilizando el análisis de regresión múltiple. En la planta de tratamiento del club Avándaro se ha observado, en la gran mayoría de los casos, una disminución en el porcentaje de hibridación en las muestras tomadas después de la actividad en el club, lo cual indicaría un efecto de "lavado" de éstos grupos en el sistema, aunque no pueden descartarse otro tipo de causas como la depredación de ciliados, o la lisis por virus.

En el sistema de tratamiento Cognis-Henkel, los grupos Betaproteobacteria y Deltaproteobacteria fueron los que mostraron porcentajes de hibridación más constantes a lo largo del estudio, asumiendo que las poblaciones hacia el interior de estos grupos sean poblaciones autótrofas y quimiorganotrofas (del ciclo de nitrógeno y del azufre respectivamente), el comportamiento observado concordaría en términos generales con la hipótesis probada, en que las poblaciones autótrofas no sufren cambios en la contenido celular de ARNr. La conclusión se apoya también en el hecho, que la planta recibe alta carga de los xenobioticos. En la planta de tratamiento del club Avándaro fueron Bacteroidetes (cuyos miembros en aguas residuales generalmente se asocian con la degradación de compuestos de alto peso molecular) y Deltaproteobacteria los grupos que mostraron porcentajes de hibridación más constantes

La dominancia de los grupos Betaproteobacteria y Bacteroidetes en ambos sistemas de tratamiento confirma observaciones realizadas en numerosos trabajos anteriores que se ocupan de la estructura de la comunidad microbiana. La dinámica observada en ambos sistemas de tratamiento permite concluir que los cambios en la estructura de la comunidad no son determinantes en la eficiencia de remoción de la DBO₅ en los sistemas estudiados (sistemas diseñados únicamente para la remoción de la DBO₅). Sin embargo, el mal control del tiempo de retención de la biomasa (observada en la planta del club Avándaro) se reflejó tanto en la fluctuación de la concentración de ésta, responsable de la eficiencia en la remoción del carbono orgánico, como en la disminución de los números de ciertos grupos de bacterias.

9. REFERENCIAS

- Amann, R., Fuchs, B. M. y Behrens, Fibrobacteres Fibrobacteres S. 2001. The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridisation. *Current Opinion in Biotechnology*. 12: 231–236.
- Andreottola, G., Baldassarre, L., Collivignarelli, C., Pedrazzani, P., Principi, C., Sorlini, C. y Ziglio, G. 2001a. A comparison among different methods for evaluating the biomass activity in activated sludge systems: Preliminary Results. En: Tandoi, V., Passino, R. y Blundo, C.M. (Eds): Proc. 3rd IWA International Specialised Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes, 13-15.07. Rome, Italy, Paper 11(CD).
- Andreottola, G., Fodadori, P., Gelmini, A. y Ziglio, G. 2001b. Biomass active fraction evaluated by a direct method and respirometric techniques. En: Tandoi, V., Passino, R. y Blundo, C.M. (Eds): Proc. 3rd IWA International Specialised Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes, 13-15.07. 2001 Rome, Italy, 273 – 282 pp. (CD).
- Aoi, Y., Miyoshi, T., Okamoto, T., Tsuneda, S., Hirata, A., Kitayama, A. y Nagamune, T. 2000. Microbial ecology of nitrifying bacteria in wastewater treatment process examined by fluorescence *in situ* hybridization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 90 (3): 234 – 240.
- Ballinger, S.J., Curtis, T. P. Godley, A. R. y Head, I. M. 2001. The effect of C/N ratio on ammonia oxidising bacteria community structure in a laboratory nitrification – denitrification reactor. En: Tandoi, V., Passino, R. y Blundo, C.M. (Eds): Proc. 3rd IWA International Specialised Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes, 13-15.07. Rome, Italy, 418 – 425 pp. (CD).
- Beer, M., Hong, Y. H. y Seviour, R. J. 2004. Are some putative glycogen accumulating organisms (GAO) in anaerobic: aerobic activated sludge systems members of the α -proteobacteria? *Microbiology*. 150: 2267 – 2275.
- Bel'kova, N. L., Dryukker, v. V., Hong, S. H. y Ahn, T. S. 2003. A study of the composition of the aquatic bacterial community of Lake Baikal by the *in situ* hybridization method. *Microbiology*. 72: 244 – 245.
- Björnsson, L., Hugenholtz, P., Tyson, G. W. y Blackall, L. 2002. Filamentous Chloroflexi (green non-sulphur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. *Microbiology*. 148 2309 – 2318.
- Bond, P. L., Erhart, R., Wagner, M., Keller, J. y Blackall, L. L. 1999. Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and nonefficient biological phosphorus removal activated sludge systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (9): 4077 – 4084.
- Carvalho, G., Novais, M.J. y Pinheiro, H.M. 2003. Activated sludge acclimatization kinetics to non-ionic surfactants. *Environmental Technology*. 24: 109-114.

- Curds, C.R. 1973. The role of protozoa in the activated sludge process. *American Zoologist* 13: 161-169.
- da Motta, M., Pons, M. N. y Roche, N. 2001. Study of filamentous bacteria by image analysis and relation with settleability. En: Tandoi, V., Passino, R. y Blundo, C.M. (Eds): Proc. 3rd IWA International Specialised Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes, 13-15.07. 2001 Rome, Italy, 265 – 272 pp. (CD).
- Ebie, Y., Miura, H., Noda, N., Matsumura, M. Tsuneda, S. Hirata, A. y Inamori, Y. 2001. Detection and quantification of expression of AmoA by competitive reverse transcription – PCR. En: Tandoi, V., Passino, R. y Blundo, C.M. (Eds): Proc. 3rd IWA International Specialised Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes, 13-15.07. 2001 Rome, Italy, 210 – 217 pp. (CD).
- Egli, K., Langer, C., Siegrist, H. R., Zehnder, A. J. B., Wagner, M. y van der Meer, J. R. 2003. Community analysis of ammonia and nitrite oxidizers during start – up of nitrification reactors. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (6): 3213 – 3222.
- Eschenhagen, M., Schuppler, M y Röske, I. 2003. Molecular characterization of the microbial community structure in two activated sludge systems for the advanced treatment of domestic effluents. *Water Research*. 37: 3224 – 3232.
- Falkentoft, C. M., Müller, E., Arnz, P., Harremoës, P., Mosbaek, H., Wilderer, P. A. y Wuertz, S. 2002. Population changes in a biofilm reactor for phosphorus removal as evidenced by the use of FISH. *Water Research*. 36: 491 – 500.
- Frigon, D., Amaiz, E., Oerther, D.B. y Raskin, L. 2001. Who eats what? Classifying microbial populations based on diurnal profiles of rRNA levels. En: Tandoi, V., Passino, R. y Blundo, C.M. (Eds): Proc. 3rd IWA International Specialised Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes, 13-15.07. 2001 Rome, Italy, 1 – 11pp. (CD).
- Glöckner, F. O., Fuchs, B. M. y Amann, R. 1999. Bacterioplankton composition of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence *in situ* hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 3721 – 3726.
- Grasshoff, K. 1983. Determination of nutrients, determination of nitrite. In: Grasshoff, K., Ehrhardt, M. y Kremling, K. (Eds). *Methods of seawater analysis*. Verlag Chemie. Germany. 139 – 150 pp.
- Hall, S. J., Keller, J. y Blackall, L.L. 2003. Microbial quantification in activated sludge: the hits and the misses. *Water Science and Technology*. 48 (3): 121 – 126.
- Helmer – Madhok, C., Schmid, M., Filipoy, E., Gaul, T., Hippen, A., Rosenwinkel, K., Seyfried, C.F., Wagner, M. y Kunst, S. 2001. Deammonification, in biofilm systems: population structure and function. En: Tandoi, V., Passino, R. y Blundo, C.M. (Eds): Proc. 3rd IWA International Specialised Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes, 13-15.07. 2001 Rome, Italy, 170 – 179 pp. (CD).

- Jang, A., Yoon, Y.H., Kim, I. S., Kim, K. S. y Bishop, P. L. 2003. Characterization and evaluation of aerobic granules in sequencing batch reactor. *Journal of Biotechnology*. 105: 71 – 82.
- Jang, A., Okabe, S., Watanabe, Y., Kim, I.S. y Bishop, P. L. 2005. Measurement of growth rate of ammonia oxidizing bacteria in partially submerged biological contactor by fluorescent in situ hybridization (FISH). *Journal of Environmental Engineering and Science*. 4 (5): 413 – 420.
- Kaewpipat, K. y Grady, C.P.L. Jr. 2001. Population dynamics in laboratory – scale activated sludge reactors. En: Tandoi, V., Passino, R. y Blundo, C.M. (Eds): *Proc. 3rd IWA International Specialised Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes, 13-15.07. 2001 Rome, Italy*, 19 – 26 pp. (CD).
- Katehis, D., Fillos, J. y Carrio, L. A. 2001. Comparison of bench scale testing methods for nitrifier growth rate measurement. En: Tandoi, V., Passino, R. y Blundo, C.M. (Eds): *Proc. 3rd IWA International Specialised Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes, 13-15.07. 2001 Rome, Italy*, 218 – 224 pp. (CD).
- Kim, D. J., Kim, T. K., Choi, E. J., Park, W. C., Kim, T. H., Ahn, D. H., Yuan, Z., Blackall, L. y Keller, J. 2004. Fluorescence in situ hybridization analysis of nitrifiers in piggery wastewater treatment reactors. *Water Science and Technology*. 49 (5 – 6): 333 – 340.
- Kindaichi, T., Ito, T. y Okabe, S. 2004. Ecophysiological Interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiography – fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (3): 1641 – 1650.
- Kong, Y. H., Beer, M., Rees, G. N y Seviour, R. J. 2002. Functional analysis of microbial communities in aerobic – anaerobic sequencing batch reactors fed with different phosphorus/carbon (P/C) ratios. *Microbiology*. 148: 2299 – 2307.
- Konopka, A., Zakharova, T. y Nakatsu, C. 2002. Effect of starvation Length Upon Microbial Activity in a Biomass Recycle Reactor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 29: 286 – 291.
- Koroleff, F. 1983a. Determination of nutrients, determination of ammonia – nitrogen. En: Grasshoff, K., Ehrhardt, M. y Kremling, K. (Eds). *Methods of seawater analysis*. Verlag Chemie. Germany. 151 – 157 pp.
- Koroleff, F. 1983b. Determination of nutrients, determination of phosphorus. En: Grasshoff, K., Ehrhardt, M. y Kremling, K. (Eds). *Methods of seawater analysis*. Verlag Chemie. Germany. 125 – 139 pp.
- LaPara, T. M., Zakharova, T., Nakatsu, C.H. y Konopka, A. 2001. Functional and structural adaptations of bacterial communities growing on particulate substrates under stringent nutrient limitation. *Microbial Ecology*. 44: 317 – 326.

- Lee, N., Jansen, J., Aspegren, H., Dircks, K., Henze, M., Nielsen, P., Schleifer, K. y Wagner, M. 2001. Population dynamics and in situ physiology of phosphorus – accumulating bacteria in wastewater treatment plants with enhanced biological phosphorus removal operated with and without nitrogen removal. En: Tandoi, V., Passino, R. y Blundo, C.M. (Eds): Proc. 3rd IWA International Specialised Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes, 13-15.07. 2001 Rome, Italy, 114 – 122 pp. (CD).
- Lishman, L. A., Legge, R. L y Farquhar, G. J. 2000. Temperature effects on wastewater treatment under aerobic and anoxic conditions. *Water Research*. 34 (8): 2263 – 2276.
- Love, N. G. y Bott, C. B. 2001. Evaluating the role of microbial stress response mechanisms in causing biological treatment system upset. En: Tandoi, V., Passino, R. y Blundo, C.M. (Eds): Proc. 3rd IWA International Specialised Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes, 13-15.07. 2001 Rome, Italy, 11 – 19 pp. (CD).
- Manser, R., Gujer, W. y Siegrist, H. 2006. Decay processes of nitrifying bacteria in biological wastewater treatment systems. *Water Research*. 40 (12): 2416 – 2426.
- Manz, W., Eisenbrecher, M., Neu, T. R. y Szewzyk, U. 1998. Abundance and spatial organization of Gram-negative sulfate-reducing bacteria in activated sludge investigated by in situ probing with specific 16S rRNA targeted oligonucleotides. *FEMS Microbiology Ecology*. 43 – 61.
- Martínage, V. y Paul, E. 2000. Effect of environmental parameters on autotrophic decay rate (bA). *Environmental Technology*. 21: 31 – 41.
- Miki, T. y Yamamura, N. 2005. Effects of asynchronous fluctuations in DOC supply and bacterial growth on biodegradation efficiency. *Ecological Modeling*. 183 (2 – 3): 281 – 299.
- Miskin, I. P., Rayne, D., Head, I. M. y Curtis, T. P. 2001. Synchronous bacterial community assembly in replicate sequencing batch reactors initiated with different seeds. En: Tandoi, V., Passino, R. y Blundo, C.M. (Eds): Proc. 3rd IWA International Specialised Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes, 13-15.07. 2001 Rome, Italy, Poster No 140 (CD).
- Molin, S. y Givskov, M. 1999. Application of molecular tools for in situ monitoring of bacterial growth activity. *Environmental Microbiology*. 1: 383 – 391.
- Morgenroth, E. y Wilderer, P.A. 1999. Continuous flow and sequential processes in municipal wastewater treatment. En: Winter, J. (Ed.) *Environmental processes 1. Wastewater treatment*. 2a Edición. Wiley – VCH. Germany. 321 – 334 pp.
- Motulsky, H.J., 1999: *Analyzing data with GraphPad Prism*. GraphPad Software inc., San Diego SA, USA.

- Nielsen, J. y Nielsen, P. H. 2001. Quantification of functional groups in activated sludge by microautoradiography. En: Tandoi, V., Passino, R. y Blundo, C.M. (Eds): Proc. 3rd IWA International Specialised Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes, 13-15.07. 2001 Rome, Italy, 290 – 296 pp. (CD).
- Nielsen, P. H., Thomsen, T. R. y Nielsen, J. L. 2004. Bacterial composition of activated sludge – importance for floc and sludge properties. *Water Science and Technology*. 49 (10): 51 – 58.
- NMX – AA – 012.1999. Análisis de agua. Determinación de oxígeno disuelto en aguas naturales y residuales.
- NMX – AA – 028 – 1999. Análisis de agua. Determinación de la demanda bioquímica de oxígeno en aguas naturales y residuales (DBO₅).
- NMX – AA – 034 – 2001. Análisis de agua. Determinación de sólidos.
- Nogueira, R. y Melo, L. F. 2006. Competition between *Nitrospira* spp. and *Nitrobacter* spp. in nitrite-oxidizing bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 95 (1): 169 – 175.
- Okabe, S., Naitoh, H., Satoh, H. y Watanabe, Y. 2001. Structure and function of nitrifying biofilms as determined by molecular techniques and the use of microelectrodes. En: Tandoi, V., Passino, R. y Blundo, C.M. (Eds): Proc. 3rd IWA International Specialised Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes, 13-15.07. 2001 Rome, Italy, 179 – 187 pp. (CD).
- Onuki, M., Satoh, H., Mino, T. y Matsuo, T. 2000. Application of molecular methods to microbial community analysis of activated sludge. *Water Science and Technology*. 42 (3 – 4): 17 – 22.
- Otawa, K., Asano, R., Ohba, Y., Sasaki, T., Kawamura, E., Koyama, F., Nakamura, S. y Nakai, Y. 2006. Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria community in intermittent aeration sequencing batch reactors used for animal wastewater treatment. *Environmental Microbiology*. 8 (11): 1985 – 1996.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J. y Amann, R. 2002. Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 3094 -3101.
- Pollard, P. C. y Greenfield, P. F. 1997. Measuring in situ bacterial specific growth rates and population dynamics in wastewater. *Water Research*. 31 (5): 1074 – 1082.
- Pollard, P. C. 2006. A rapid, direct measurement of bacterial growth rate in anaerobic wastewater treatment. *Water Environment Research*. 78 (2): 189 – 195.

- Prinčič, A., Mahne, I., Megušar, F., Paul, E. A. y Tiedje, J. M. 1998. Effects of pH and oxygen and ammonium concentrations on the community structure of nitrifying bacteria from wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (10): 3584 – 3590.
- Ravenschlag, K., Sahm, K. y Amann, R. 2001. Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine arctic sediments (Svalbard). *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (1): 387 – 395.
- Rittmann, B.E. y McCarty, P.L. 2001. *Environmental biotechnology: Principles and applications*. 2nd Edition. Mc Graw Hill. USA. 743 pp.
- Rosenberg, S., Witzig, R., Manz, W., Szewzky, U. y Kraume, M. 2000. Operation of different membrane reactors: experimental results and physiological state of the microorganisms. *Water Science and Technology*. 41 (10 – 11): 269 – 277.
- Ryuoyu, C. y LaPara, T.M. 2006. Aerobic biological treatment of low-strength synthetic wastewater in membrane-coupled bioreactors: the structure and function of bacterial enrichment cultures as the net growth rate approaches zero. *Microbial Ecology*. 51 99 -108.
- Schramm, A., Santegoeds, C.M., Nielsen, H. K., Ploug, H., Wagner, M., Pribyl, M., Wanner, J., Amann, R. y De Beer, D. 1999. On the occurrence of anoxic microniches, denitrification, and sulfate reduction in aerated activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (9): 4189 – 4196.
- Seoanez, C. M. 1995. *Ecología Industrial: Ingeniería medioambiental aplicada a la industria y a la empresa. Manual para responsables medioambientales*. Colección Ingeniería medioambiental. Ediciones Mundiprensa. Madrid. 193 – 201 pp.
- Siyambalapitiya, N. y Blackall, L.L. 2005. Discrepancies in the widely applied GAM42a fluorescence *in situ* hybridisation probe for Gammaproteobacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 242 367 – 373.
- Stasinakis, A. S., Mamais, D., Paraskevas, P. A. y Lekkas, T.D. 2003. Evaluation of Different Methods for the determination of maximum heterotrophic growth rates. *Water Environment Research*. 75 (6): 549 – 552.
- Swisher, R.D. 1987. Surfactant biodegradation. En: Schick M, J. and Fowkes, F. M (eds). *Surfactant Science Series (Vol. 18)*. 2nd Edition. Marcel Dekker Inc. USA. 1085 pp.
- Tsai, C. S. y Liu, W. T. 2001. Phylogenetic and physiological diversity of tetrad – forming organisms in deteriorated biological phosphorus removal systems. En: Tandoi, V., Passino, R. y Blundo, C.M. (Eds): *Proc. 3rd IWA International Specialised Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes*, 13-15.07. 2001 Rome, Italy, 131 – 137 pp. (CD).

- Uphoff, H. U., Felske, A., Fehr, W. y Wagner – Döbler, I. 2001. The microbial diversity in picoplankton enrichment cultures: a molecular screening of marine isolates. *FEMS Microbiology Ecology*. 35: 249 – 258.
- van der Gast, J.C., Lilley, K.W., Ager, D. y Thompson, P.I. 2005. Island size and bacterial diversity in an archipelago of engineering machines. *Environmental Microbiology*. 7(8): 1220-1226.
- van der Gast, J.C., Jefferson, B., Reid, E., Robinson, T., Bailey, J.M., Judd, J.S. y Thompson, P.I. 2006. Bacterial diversity is determined by volume in membrane bioreactors. *Environmental Microbiology*. 8(6): 1048-1055.
- Vanrolleghem, P. A. Sin, G. y Gernaey, K. V. 2004. Transient response of aerobic and anoxic activated sludge activities to sudden substrate concentration changes. *Biotechnology and Bioengineering*. 86 (3): 277 – 290.
- Wagner, M., Loy, A., Nogueira, R., Purkhold, U., Lee, N. y Daims, H. 2002. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie van Leeuwenhoek*. (81): 665 – 680.
- Wingender, J. y Flemming, H.C. 1999. Autoaggregation of Microorganisms: Flocs and Biofilms. In: Winter, J. (Ed.) *Environmental processes 1. Wastewater treatment*. 2nd Edition. Wiley – VCH. Germany. 65 – 83 pp.
- Withey, S., Cartmell, E., Avery, L.M. y Stephenson, T. 2005. Bacteriophages-potential for application in wastewater treatment processes. *Science of Total Environment*. 339: 1-18.
- Wong, M. T., Tan, F. M., Ng, W. J. y Liu, W. T. 2004. Identification and occurrence of tetrad – forming Alphaproteobacteria in anaerobic – aerobic activated sludge processes. *Microbiology*. 150: 3741 – 3748.
- Wilén, B.M., Gapes, D., Blackall, L.L. y Keller, J. 2004. Structure and microbial composition of nitrifying microbial aggregates and their relation to internal mass transfer effects. *Water Science and Technology*. 50 (10): 213 – 220.
- Wyffels, S., Van Hulle, S. W. H., Boeckx, P., Volcke, E. I. P. Van Cleemput, O., Vanrolleghem, P. A. y Verstraete, W. 2004. Modeling and simulation of oxygen-limited partial nitritation in a membrane-assisted bioreactor (MBR). *Biotechnology and Bioengineering*. 86 (5): 531 – 542.
- Zilles, J. L., Hung, C. H. y Noguera, D. R. 2001. Presence of Rhodocyclus in a full - scale wastewater treatment plant and their participation in enhanced biological phosphorus removal. En: Tandoi, V., Passino, R. y Blundo, C.M. (Eds): *Proc. 3rd IWA International Specialised Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes, 13-15.07. 2001 Rome, Italy*, 75 – 81 pp. (CD).
- Zeng, J. R. Saunders, J. A., Yuan, Z., Blackall, L. L. y Keller, J. 2003. Identification and comparison of aerobic and denitrifying polyphosphate-accumulating organisms. *Biotechnology and Bioengineering*. 83 (2): 140 – 148.

ANEXO1 Surfactantes Producidos en la Empresa Cognis–Henkel

Tipo de Surfactante	Información General
ANIÓNICOS	
Alquil benzeno sulfonatos	Presencia ocasional No se monitorea la emisión
Alcano sulfonatos 1°	Presencia ocasional No se monitorea la emisión
Ester y amida sulfonatos	Presencia Constante
Sulfo ácidos grasos	Presencia constante
Ésteres de sulfosuccinato	Presencia ocasional No se monitorea la emisión
Alquil sulfatos 1°	Presencia constante
Alquil sulfatos 2°	Presencia constante
CATIÓNICOS	
Alquil amina	Presencia constante
Alquilamina etoxilato	Presencia constante
NO IÓNICOS	
Alcohol etoxilatos	Presencia constante
Alquil fenol etoxilatos	Presencia ocasional No se monitorea su emisión

ANEXO 2 Grupos Microbianos Presentes en Lodos Activados^a

Grupo	Subgrupo	Género/especie	Actividad	Observaciones
Proteobacteria	<i>Alpha</i>	<i>Nitrobacter</i>	Oxida nitrito	Parece necesitar más oxígeno y nitrito que <i>Nitrospira</i>
		<i>Paracoccus</i>	Desnitrificación	
		<i>Hyphomicrobium</i>		
		<i>Xanthomonas</i>		
		<i>Amaricoccus</i>	G-bacteria	
	<i>Beta</i>	<i>Zooglea ramigera</i>		
		<i>Azoarcus</i>	Desnitrificación	
		<i>Alcaligenes latus</i>	Desnitrificación	
		<i>Brachyomonas denitrificans</i>	Desnitrificación	
		<i>Nitrosomonas</i>	Oxidación de amoníaco	Son las más frecuentemente encontradas, al parecer tienen mayor actividad a altas concentraciones de amonio
		<i>Nitrosococcus</i>		
		<i>Nitrosolobus</i>		
		<i>Nitrospira</i>		
		<i>Nitrosovibrio</i>		
		<i>Rhodocyclus</i>	PAO	
	<i>Gamma</i>	<i>Pseudomonas</i>	Desnitrificación	
		<i>Acinetobacter</i>	GAO	
	<i>Delta</i>	<i>Desulfococcus</i>	Reducción de sulfato	
		<i>Desulfosarcina</i>		
		<i>Desulfobotulus</i>		
		<i>Desulfobacterium</i>		
		<i>Desulfobacter</i>		
		<i>Desulfobulbus</i>		
Acidobacteria				
Actinobacteria (G positiva High G+C)		<i>Microlunatus</i>	PAO/G-bacteria	
		<i>Micropurina</i>	G-bacteria	
		<i>Friedmanniella</i>		
		<i>Tessaracoccus</i>		
		<i>Tetrasphaera</i>		
Bacteroidetes				

Chlorobi				
Chloroflexi				
Fibrobacteres				
Firmicutes				
Nitrospira		<i>Nitrospira</i>	Oxida Nitrito	No cultivado aun, bien adaptado a bajas concentraciones de oxígeno y nitrito
Planctomycetes				
Verrucomicrobia				

a: (Wagner *et al.*, 2002)