



Limitaciones en la identificación convencional del morfotipo filamentoso *Nostocoida limicola* II en fangos activos

Sara Calvo García licenciada en Ciencias Biológicas, Grupo de Química y Microbiología del Agua del Instituto Universitario de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente (IIAMA) de la Universitat Politècnica de València

Andrés Zornoza Zornoza licenciado en Ciencias Químicas y personal investigador del Grupo de Química y Microbiología del Agua del Instituto Universitario de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente (IIAMA) de la Universitat Politècnica de València

José Luis Alonso Molina doctor en Ciencias Biológicas y responsable del Grupo de Química y Microbiología del Agua del Instituto Universitario de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente (IIAMA) de la Universitat Politècnica de València

El crecimiento excesivo de bacterias filamentosas en fangos activos origina episodios de *bulking* y *foaming* en las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR). Entre las bacterias más comunes causantes de dichos episodios se encuentran aquellas denominadas bajo el morfotipo *Nostocoida limicola*. La diversa ecofisiología de las bacterias que representan *N. limicola*, especialmente aquellas que se engloban dentro de *N. limicola* II, sugiere que las medidas correctoras a tomar pueden ser distintas y, por tanto, la identificación convencional llevar a una incorrecta toma de decisiones en la EDAR. Por ello, el objetivo principal de este estudio ha sido identificar y valorar la abundancia de las distintas especies de *N. limicola* II en tres EDAR de la Comunidad Valenciana, empleando para ello la técnica de hibridación *in situ* con sondas 16S/23S rDNA marcadas con fluoróforos (FISH). Los resultados han permitido determinar su frecuencia de aparición en función de las distintas variables de control del proceso, sugiriendo que la identificación de *N. limicola* II a través de la técnica convencional sería inadecuada para la posterior toma de decisiones en la EDAR, siendo la técnica FISH la más adecuada en estos casos.

Palabras clave

EDAR, fangos activos, bacterias filamentosas, *bulking*, *foaming*, *Nostocoida limicola*.

Limitations in conventional identification of filamentous morphotype *Nostocoida limicola* II in activated sludges

Excessive growth of filamentous bacteria causes bulking and foaming in activated sludge wastewater treatment plants (WWTP). One of the most common bacterial group responsible of these operational problems is known as *Nostocoida limicola* morphotype. The different ecophysiology of bacteria that represent *N. limicola*, especially those that are found within *N. limicola* II, suggests that the measures corrective to control the excessive growth can be different. Therefore, the conventional identification might place lead to a wrong decision in the WWTP. The main aim of this study was to identify and estimate the abundance of the different species of *N. limicola* II in three WWTP from the Comunidad Valenciana (Spain) using the fluorescence *in situ* hybridization technique (FISH). The results have enabled us to determine their frequency depending on the different variables of the process control, suggesting that the identification of *N. limicola* II with the conventional technique would be unsuitable for further decision making in the WWTP, being the most appropriate the FISH technique.

Keywords

WWTP, activated sludge, filamentous bacteria, *bulking*, *foaming*, *Nostocoida limicola*.



1. Introducción

Las bacterias filamentosas son organismos habituales, junto con protistas y metazoos, de la microbiota de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), contribuyendo principalmente a la degradación de la materia orgánica y desempeñando un papel esencial en la formación flocular (Madoni *et al.*, 2000).

El buen funcionamiento de cualquier proceso de depuración se basa fundamentalmente en el equilibrio de todos los microorganismos que crecen y estructuran el flóculo del fango activo. Una presencia moderada de organismos filamentosos contribuye a una buena formación del flóculo, cuya abundancia relativa en condiciones normales no excede aproximadamente del 1-3% del total de la biomasa (Kragelund *et al.*, 2009), mientras que el crecimiento excesivo de dichos organismos origina importantes problemas de separación del fango activo en el clarificador secundario.

De todos ellos, los episodios de *foaming* (o espumación) y *bulking* (o esponjamiento) son los más comunes en las EDAR con sistema de fangos activos, siendo las causas que los originan descritas y discutidas por numerosos autores (Eikelboom 1975, 2000, 2006; Blackall *et al.*, 1985; Seviour y Blackall, 1999; Jenkins *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2009; Tandoi *et al.*, 2006; Mielczarek *et al.*, 2012).

Con el fin de controlar el crecimiento excesivo de bacterias filamentosas en las EDAR, se hace imprescindible en primer lugar su correcta identificación, así como el conocimiento de los factores que originan su desarrollo. El crecimiento excesivo de dichas poblaciones bacterianas ha causado graves problemas operacionales desde el momento que comenzaron a ser identificadas en las primeras ins-

talaciones de fangos activos. A partir del año 1970 fueron numerosos los estudios que intentaron desarrollar métodos adecuados para controlar estos organismos, basados en una mejor comprensión de su identidad, fisiología y ecología. Se han descrito más de 30 morfotipos filamentosos diferentes en sistemas de fangos activos tratando principalmente aguas residuales urbanas (Eikelboom *et al.*, 1975, 2000; Jenkins *et al.*, 2004), y muchos más, que se encuentran entre las comunidades bacterianas de las EDAR industriales (Eikelboom y Geurkink, 2002; Eikelboom, 2006; Zornoza *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2008). Entre los años 1970 y 1973 fueron publicados numerosos estudios revelando una gran cantidad de bacterias filamentosas relacionadas con los episodios de *bulking* (Cyrus y Sladka, 1970; Farquhar y Boyle, 1971; Mulder *et al.*, 1971; Van Veen *et al.*, 1973; Sladka y Ottova, 1973).

Estas publicaciones sirvieron en 1975 a Eikelboom para sentar las primeras bases de lo que sería posteriormente la identificación convencional de bacterias filamentosas, que consiste en la observación de las características morfológicas mediante microscopía óptica de contraste de fases, así como la respuesta a las tinciones diferenciales de Gram y Neisser, de ahí el término de morfotipo o tipo. Desde entonces, un gran número de bacterias filamentosas han sido identificadas tradicionalmente en las EDAR a través de dichas características, utilizando principalmente como referencia los manuales de Eikelboom (2000) y Jenkins *et al.* (2004).

Sin embargo, debido a que una misma especie puede mostrar polimorfismo o diferentes especies parecer iguales morfológicamente, como es el caso de las bacterias pertenecientes al morfotipo *Nostocoida limicola*, actualmente solo unos pocos

microorganismos filamentosos pueden ser identificados de forma fiable a partir del sistema de identificación convencional, los cuales incluyen *Candidatus Microthrix parvicella* y Nocardioformes. En este sentido, algunos estudios han demostrado las limitaciones de la técnica convencional en la identificación de los morfotipos filamentosos 0803, 0914 y 0092 en fangos activos (Andujar *et al.*, 2013), mientras que otros han demostrado las distintas relaciones con las variables de proceso de organismos filamentosos pertenecientes al género *Thiothrix* (Romera *et al.*, 2013).

Con el desarrollo de métodos moleculares de cultivo independiente, el conocimiento de la identificación de filamentosos y otras poblaciones características de fangos activos ha aumentado de forma considerable en la última década. Su aplicación, especialmente la técnica de hibridación *in situ* con sondas 16S/23S rDNA marcadas con fluoróforos (FISH), ha permitido esclarecer la posición taxonómica de numerosas bacterias del fango activo, a pesar de la todavía incompleta fisiología y ecología de muchas de ellas. Las técnicas moleculares más utilizadas en estudios de diversidad microbiana a nivel genético son aquellas basadas en la amplificación y secuenciación del gen 16S, que codifica para la subunidad ribosómica bacteriana (siendo su equivalente en eucariotas la subunidad 18S rRNA). La técnica FISH se ha convertido en uno de los métodos más ampliamente utilizados cuando se estudian la filogenia y taxonomía de los microorganismos directamente en sistemas complejos sin aislamiento y cultivo previo. Esta técnica se basa en la formación de un complejo o híbrido DNA-RNA de la bacteria diana con una sonda complementaria a una región del

gen 16S rRNA o 23S rRNA. La especificidad de las sondas 16S rDNA, además, puede ser ajustada mediante el porcentaje de formamida a diferentes niveles taxonómicos, como son dominio, filo, clase, familia, género y especie, para la identificación de las bacterias en sus diferentes comunidades naturales (Amann et al., 1995). Hasta el momento se ha identificado la posición taxonómica de numerosas bacterias filamentosas, que anteriormente se identificaban como morfotipos a través del uso de la microscopía convencional, diseñándose sondas para muchas de estas bacterias (Schade et al., 2002; Snaidr et al., 2002; Jenkins et al., 2004; Eikelboom et al., 2006; Kragelund et al., 2009).

Tanto la técnica convencional como la técnica FISH presentan ventajas y limitaciones. La metodología convencional contempla el estudio de los microorganismos a partir del cultivo puro, aunque la mayoría de ellos no han podido ser todavía aislados. Además, puesto que se basa en la observación de las características morfológicas, estas pueden aparecer en diversos morfotipos, e incluso muchos morfotipos pueden parecer distintos morfológicamente bajo condiciones ambientales distintas (Richard et al., 1985; Buali y Horan, 1989; Seviour et al., 1997). También existen diferentes bacterias que aunque pueden parecer la misma a través del uso de la microscopía convencional, presentan claras diferencias fisiológicas y taxonómicas, como por ejemplo el morfotipo *Nostocoida limicola*.

Diversos estudios han revelado que los tres morfotipos de *Nostocoida limicola* (I, II y III) se engloban en cinco grupos filogenéticos distintos (Blackall et al., 2000; Liu et al., 2000; Seviour et al., 2000; Schade et al., 2002; Snaidr et al., 2002;

Con el empleo de las técnicas moleculares se ha ido resolviendo parte de la problemática sobre la situación filogenética de la bacteria *Nostocoida limicola*: los tres morfotipos se distribuyen en cinco fila distintos

Levantesi et al., 2004). El método convencional, aunque es rápido y económico, se encuentra limitado por la subjetividad y experiencia del observador. Por un lado, pese a que la técnica FISH no precisa de cultivos puros, no existen sondas de rDNA para todas las bacterias filamentosas. Además, las sondas en ocasiones no pueden acceder a los ribosomas, bien por problemas de permeabilidad celular o por limitaciones de acceso de la sonda a la zona diana del ribosoma, dando falsos negativos. Por otro lado, las células necesitan estar metabólicamente activas con altos niveles de ribosomas para dar respuestas positivas, por ello, los falsos negativos también son posibles. También hay que tener en cuenta que las bases de datos de secuencias del gen rRNA disponibles para el diseño de sondas están todavía incompletas, por tanto, el riesgo de falsos positivos de poblaciones cuyas secuencias de 16S rRNA no han sido depositadas es posible. Por último, hay que señalar que es también un procedimiento algo más lento y caro. Todos estos factores demuestran que ninguna de estas técnicas de identificación es inequívoca y que no son excluyentes una de la otra, y que empleadas conjuntamente forman un sistema de identificación de bacterias filamentosas muy eficaz.

2. El morfotipo filamentoso *Nostocoida limicola*

Descrito por primera vez por Van Veen en 1973, la bacteria filamentosa *N. limicola* se aisló de fangos

activos caracterizándose como Gram positiva, con forma de cocos en cadenas, crecimiento lento y sin motilidad. Años más tarde se consideró que esta bacteria se constituía en tres morfotipos diferenciados: *Nostocoida limicola I*, *Nostocoida limicola II* y *Nostocoida limicola III* (Eikelboom y Van Buijssen, 1983).

Aunque un gran número de estudios en EDAR de Europa han demostrado la distribución de *N. limicola* (Wanner et al., 1998; Seviour y Blackall, 1999; Alonso et al., 2009), han sido escasos los esfuerzos empleados en la distinción entre los tres morfotipos, afirmando hasta no hace demasiados años que probablemente se trataba de una única especie de bacteria distribuida en tres variantes diferenciadas según el tamaño celular (Jenkins et al., 2004). Dicha afirmación ya había sido cuestionada anteriormente por Liu y Seviour (2002), puesto que los tres morfotipos engloban bacterias no relacionadas y con características fisiológicas diferentes (Kragelund et al., 2005, 2006; Seviour et al., 2008; Nielsen et al., 2009).

Con el empleo de las técnicas moleculares se ha ido resolviendo parte de la problemática sobre la situación filogenética de *Nostocoida limicola*. Los tres morfotipos en realidad se distribuyen en cinco fila distintos: filo *Proteobacteria* clase *Alphaproteobacteria* (Snaidr et al., 2002), filo *Chloroflexi* (Schade et al., 2002), filo *Firmicutes* (Liu et al., 2000), filo *Planctomycetes* (Liu et al., 2001) y filo *Actinobacteria* (Blackall et al., 2000; Liu y Seviour, 2001).



2.1. Morfotipo *Nostocoida limicola I*

Bacteria que forma filamentos curvados y enrollados irregularmente, relativamente finos (0,8-1 μm) y una longitud de 40-100 μm (Jenkins *et al.*, 2004). Inicialmente se describió como Gram y Neisser positivos, localizándose en el interior del flóculo, aunque también puede aparecer extendiéndose desde el mismo. Los filamentos carecen de motilidad, vaina, ramificaciones y crecimiento epifítico. Por su bajo contenido en guanina y citosina se localiza filogenéticamente dentro del filo Firmicutes (Liu *et al.*, 2000). Aunque este filo contiene miembros pertenecientes a los géneros *Trichococcus* y *Streptococcus*, el estudio de su metabolismo, crecimiento y secuenciación del 16S rRNA sitúa a las bacterias aisladas de *N. limicola I* dentro del género *Trichococcus* (Liu y Seviour, 2001), estando muy relacionadas y cercanas a *Trichococcus flocculiformis* (Scheff *et al.*, 1984) y a *Trichococcus pasteurii* (Liu *et al.*, 2002), conocida previamente como *Lactosphaera pasterurii* (Janssen *et al.*, 1995).

2.2. Morfotipo *Nostocoida limicola II*

Bacteria de filamentos curvados y enrollados irregularmente con un diámetro aproximado de 1,4 μm y una longitud de 50-200 μm , localizándose tanto en el interior del flóculo como extendiéndose desde el mismo (Jenkins *et al.*, 2004). Presenta septos celulares con constricciones visibles al microscopio óptico, carece de motilidad, vaina y crecimiento epifítico. Las tinciones Gram y Neisser son variables, aunque generalmente son Gram negativas y Neisser positivas. También suele presentar gránulos de polihidroxibutirato (PHB) (Jenkins *et al.*, 2004).

N. limicola II es, sin duda, el morfotipo más particular de los tres, debido principalmente a su diversidad filogenética. La secuenciación del 16S rRNA de los aislados Ben (EDAR de Bendigo en Australia) muestra que forman un clúster definido dentro del grupo de bacterias Gram positivas con alto contenido en guanina y citosina, situándose dentro de las *Actinobacterias* (Blackall *et al.*, 2000). Morfológicamente, comparten propiedades con los cocos no filamentosos del género *Tetrasphaera*, permitiendo situarlos como al menos cinco especies candidatas distintas dentro de este género (Maszenan *et al.*, 2000; McKenzie *et al.*, 2006). Así mismo, aislados del mismo morfotipo indistinguibles al microscopio óptico han resultado pertenecer al filo *Chloroflexi* (Schade *et al.*, 2002) y a la clase α -*Proteobacteria* (Snaird *et al.*, 2002).

Diversos autores han llevado a cabo desde hace pocos años estudios sobre identificación y abundancia de organismos filamentosos de los fila *Chloroflexi*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria* (clase α), así como de su ecofisiología (Kragelund *et al.*, 2005, 2006, 2007; Seviour *et al.*, 2008; Nielsen *et al.*, 2009; Mielczarek *et al.*, 2012), ayudando a entender el comportamiento de las bacterias pertenecientes al morfotipo *Nostocoida limicola* en los sistemas de fangos activos.

2.3. Morfotipo *Nostocoida limicola III*

Bacteria de filamentos curvados y enrollados irregularmente semejantes al morfotipo *N. limicola II*, pero de mayor grosor (aproximadamente 2,0 μm) y con una longitud de 100-300 μm (Jenkins *et al.*, 2004). Además, carece de motilidad, ramificaciones, vaina y crecimiento epifítico. Presenta septos celulares con cons-

tricciones claramente visibles al microscopio óptico. Sus células pueden ser esféricas, ovaladas o discoidales. De forma común presentan gránulos de PHB y son generalmente Gram y Neisser positivos.

La secuenciación de los 16S rRNA de algunos aislados o cepas Ben sitúan a los miembros agrupados en este morfotipo dentro del filo *Planctomycetes*, hibridando con la sonda PLA-46, característica de este grupo (Neef *et al.*, 1998). Su alto contenido en guanina y citosina los sitúa cercanos a *Isoosphaera pallida* (Giovannoni *et al.*, 1987), aunque son diferentes fenotípicamente a esta especie (Liu *et al.*, 2001). Otros estudios de secuenciación señalan que estas bacterias pueden aparecer en fangos activos como cocos aislados o agregados, ocasionando que su identificación mediante microscopía convencional sea prácticamente imposible. Dicha característica puede llevar a subestimar su frecuencia de aparición, lo que apoya la teoría de que algunas de estas bacterias del género *Isoosphaera* no hubieran sido descritas previamente (Seviour *et al.*, 2002).

A pesar de todo lo indicado anteriormente, todavía sigue siendo una práctica muy habitual el uso exclusivo de la técnica convencional para la identificación y estimación subjetiva de la abundancia de los morfotipos *Nostocoida limicola I, II y III* en episodios de *bulking* y *foaming*, tanto en la explotación rutinaria de las EDAR urbanas como en las EDAR industriales. La diversa ecofisiología de las especies candidatas que representan el morfotipo *Nostocoida limicola*, especialmente aquellas que se engloban dentro de *N. limicola II*, sugiere que las medidas correctoras a tomar ante dichos episodios pueden ser distintas y, por tanto, la identificación convencional puede llevar a una incorrecta toma de decisiones en la planta.

Tabla 1. Sondas empleadas para la identificación de las bacterias *Nostocoida limicola* I, II y III.

Morfotipo	Sonda	Secuencia (5'-3')	Especificidad	Referencia
I	NLIMI 91	CGCCACTATCTTCTCAGT	<i>Trichococcus</i> sp.	Liu y Seviour (2001)
II	Noli-644	TCCGGTCTCCAGCCACA	<i>Ca. 'Alysiosphaera europaea'</i>	Snaidr et al. (2002)
II	MC2-649	CTCTCCCGGACTCGAGCC	<i>Ca. 'Molinibacter batavus'</i>	Snaidr et al. (2002)
II	AHW 183	CCGACACTACCCACTCGT	<i>Nostocoida limicola</i> II (filo <i>Chloroflexi</i>)	Schade et al. (2002)
II	NLIMII 192	AGACTTTCCAGACAGGAG	<i>Tetrasphaera japonica</i>	Liu y Seviour (2001)
III	NLIMIII 301	CCCAGTGTGCCGGGCCAC	<i>Isosphaera</i> sp.	Liu y Seviour (2001)
III	NLIMIII 729	AGCATCCAGAACCTCGCT	<i>Isosphaera</i> sp.	Liu y Seviour (2001)
III	NLIMIII 830	CCATCGGCGAGCCCCCTA	<i>Isosphaera</i> sp.	Liu y Seviour (2001)

A pesar de los últimos estudios sobre la ecofisiología de las bacterias *N. limicola* (Nielsen et al., 2009; Mielczarek et al., 2012), todavía queda por esclarecer aquellas variables ambientales en EDAR a escala real que son relevantes en su dinámica poblacional. Por ello, el objetivo de este estudio ha sido identificar y valorar con la técnica FISH la abundancia de las distintas bacterias, que representan dichos morfotipos en tres EDAR de la Comunidad Valenciana. Los resultados obtenidos han permitido determinar su frecuencia de aparición en función de las distintas variables de control del proceso biológico de las instalaciones a escala real.

3. Material y métodos

3.1. Toma de muestras

Las muestras de fango activo analizadas han sido recogidas a la salida del reactor biológico en tres EDAR situadas en la Comunidad Valenciana: Cuenca del Carraixet (CX), Quart Benàger (QB) y Denia-Ondara-Pedreguer (DE), cuyas características se describen a continuación:

- EDAR Cuenca del Carraixet. Proceso Ludzack-Ettinger modificado

de flujo en pistón con dos líneas de tratamiento en paralelo. Caudal medio anual línea A+B: 15.784 m³/día. Caudal medio anual línea C+D: 23.677 m³/día. Población servida: 178.080 habitantes equivalentes.

- EDAR Quart Benàger. Proceso Ludzack-Ettinger modificado de mezcla completa con eliminación de nitrógeno mediante aireación intermitente. Caudal medio anual: 35.023 m³/día. Población servida: 166.942 habitantes equivalentes.

- EDAR Dénia-Ondara-Pedreguer. Sistema de fangos activos en régimen de oxidación total con eliminación de nitrógeno mediante alternancia de zonas anóxicas y óxicas, así como control del sistema de aireación por lógica difusa. Caudal medio anual: 19.089 m³/día. Población servida: 45.152 habitantes equivalentes.

La frecuencia de muestreo ha sido quincenal, desde diciembre de 2008 hasta diciembre de 2009, procesando un total de 93 muestras de fango activo. Todas las muestras recogidas se fijaron y permeabilizaron previamente con paraformaldehído (PFA) y etanol (EtOH) para la posterior identificación de bacterias Gram negativas y Gram positivas respectivamen-

te, siguiendo el protocolo detallado por Alonso et al. (2009).

3.2. Identificación y cuantificación de las bacterias filamentosas de las muestras

En la **Tabla 1** se muestran las sondas 16S rDNA utilizadas en la técnica FISH para la identificación de bacterias del género *Trichococcus*, *Candidatus 'Molinibacter batavus'*, *Candidatus 'Alysiosphaera europaea'*, *N. limicola* II (filo *Chloroflexi*), *Tetrasphaera japonica* y el género *Isosphaera*. Todas las sondas se encuentran marcadas con el fluoróforo Tamra en el extremo 5'. Para identificar las bacterias del género *Isosphaera* se combinaron las sondas NLIM III 301, 729 y 830 en una, denominándola NLIMIII mix.

En el proceso de hibridación se utilizó un 35% de formamida (FA) para identificar bacterias Gram negativas y un 20% para las Gram positivas, según las referencias especificadas en la **Tabla 1**. Las muestras hibridadas se observaron con microscopía de epifluorescencia con un equipo Olympus BX 50. Una vez identificadas las bacterias *Nostocoida limicola*, se estimó la abundancia de cada una de ellas a partir del índice de filamentos (IF) propuesto por Eikelboom (2000).


Tabla 2. Media, desviación estandar (DE) y rango de las variables de control del proceso.

Parámetros	Unidades	EDAR QB		EDAR CX		EDAR DN	
		Media ± DE	Rango	Media ± DE	Rango	Media ± DE	Rango
CM	kg DBO ₅ /kg SSVLM.d	0,20 ± 0,09	0,08-0,47	0,29 ± 0,10	0,12-0,43	0,09 ± 0,02	0,03-0,12
TRHr	horas	17,0 ± 2,0	14-22	6,4 ± 0,4	5,3-6,9	14,9 ± 1,9	12-19
EF	días	10,8 ± 5,7	5,2-29	7,5 ± 5,2	3,3-22	17,2 ± 5,4	10-35
T ^{ar}	°C	21,3 ± 3,7	14-29	20,2 ± 3,5	15-27	18,5 ± 4,2	11-26
SSLM	mg/L	2.460 ± 386	1.790-3.120	1.938 ± 549	1.100-2.980	3.225 ± 290	2.500-3.780
IVF	mL/g	119 ± 27	59-167	131 ± 60	76-286	109 ± 15	85-140

3.3. Variables de control del proceso biológico

Las variables de control del proceso biológico carga másica (CM), edad del fango (EF) y tiempo de retención hidráulico en el reactor (TRHr) han sido determinadas a partir de Metcalf y Eddy (2003), mientras que las variables fisicoquímicas, sólidos en suspensión del licor mezcla (SSLM), índice volumétrico de fango (IVF) y temperatura en el reactor (T^{ar}), han sido facilitadas por las empresas de explotación (**Tabla 2**).

4. Resultados y discusión

Las seis sondas aplicadas en la técnica FISH para la detección de las bacterias filamentosas *N. limicola* hibridaron positivamente en las muestras analizadas (**Figuras 1, 2 y 3**). La mayoría de las poblaciones abundantes de bacterias *N. limicola* en las muestras procesadas de fangos activos se han desarrollado bajo concentraciones bastante elevadas de oxígeno, siendo por tanto consistente con los resultados de algunos autores que confirman que estos microorganismos filamentosos son preferentemente aerobios (Kragelund *et al.*, 2005, 2006), aunque también son capaces de asimilar sustrato utilizando nitrato o nitrito como acep-

tor terminal de electrones (Blackall *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001).

Entre los resultados interesantes encontrados se encuentra la identificación del género *Trichococcus* (*N. limicola I*) como agregados de células en forma de cocos individualizadas, aunque se han encontrado localizados principalmente dentro del flóculo (**Figura 1d**). De forma común los filamentos se presentan en cadenas celulares cortas (**Figura 1a**), tal y co-

mo ha sido descrito por Liu y Seviour (2001), además de presentar una reacción positiva a las reacciones de Gram y Neisser (**Figuras 1b y c**).

La frecuencia de aparición de las bacterias filamentosas *N. limicola* ha sido representada en función del tiempo, en este caso a lo largo de las cuatro estaciones (**Figura 4**). *Tetrasphaera japonica*, *N. limicola II* (filo *Chloroflexi*), *Candidatus 'Molinitobacter batavus'* y *Candidatus 'Aly-*

Figura 1. Bacterias del morfotipo *Nostocoida limicola I* hibridando positivamente con sondas 16S rDNA. *Trichococcus sp.*, perteneciente a la EDAR QB: (a) contraste de fases, 1000x; (b) tinción de Gram, campo claro, 1000x; (c) tinción de Neisser, campo claro, 1000x; y (d) señal positiva con la sonda NLIMI 91, epifluorescencia, 1000x.

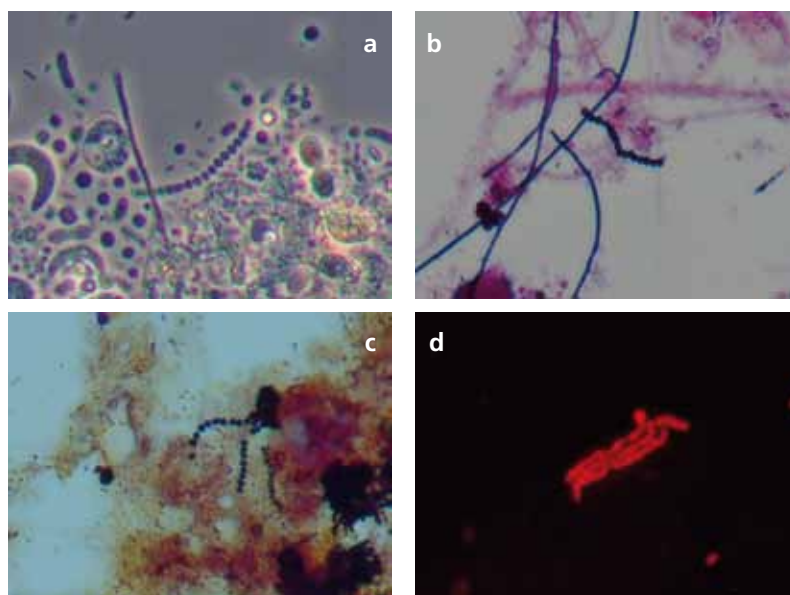
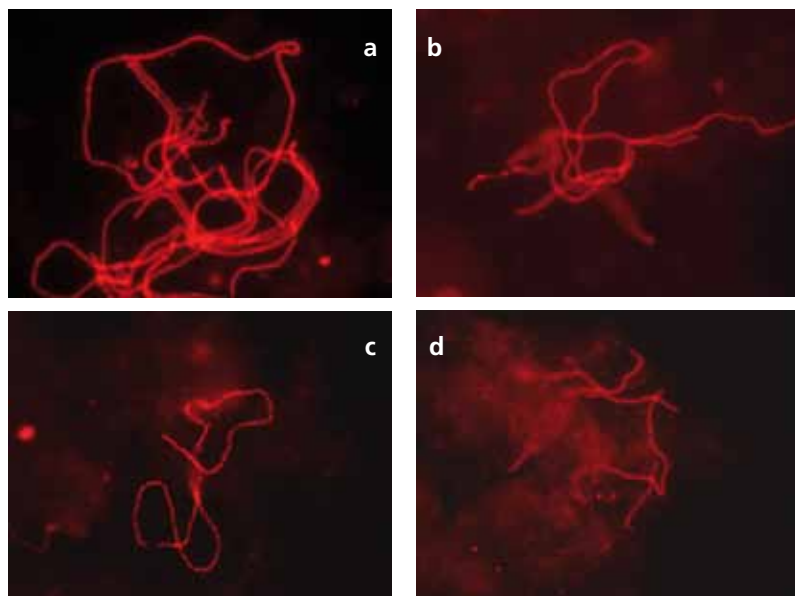


Figura 2. Bacterias del morfotipo *Nostocoida limicola II* hibridando positivamente con sondas 16S rDNA. Epifluorescencia, 1000x: (a) *Tetrasphaera japonica*, perteneciente a la EDAR QB; (b) *Nostocoida limicola II* filo *Chloroflexi*, perteneciente a la EDAR CX; (c) *Ca. 'Alysiosphaera europaea'* perteneciente a la EDAR QB; y (d) *Ca. 'Molinibacter batavus'* perteneciente a la EDAR DE.



siosphaera europaea', agrupados dentro del morfotipo *Nostocoida limicola II* (**Figura 2**), han mostrado los mayores porcentajes de ocurrencia en los biorreactores estudiados, de la misma forma que los filamentos correspondientes al género *Trichococcus*. En este sentido, los resultados estarían de acuerdo con la frecuencia de aparición encontrada por algunos autores, indicando que dichas bacterias filamentosas son comunes dentro de las comunidades microbianas del fango activo (Seviour *et al.*, 2000; Beer *et al.*, 2002; Björnsson *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2009). De hecho, *Tetrasphaera japonica* (perteneciente al filo *Actinobacteria*) (**Figura 2a**) ha sido muy común durante todo el periodo de estudio en el conjunto total de los biorreactores, corroborando la abundancia y dominancia de dicho filo encontrada por Seviour *et al.* (2006, 2008), de la misma forma que el género *Trichococcus* (perteneciente

al filo *Firmicutes*). Ambas bacterias han sido observadas con poca frecuencia, pero en ocasiones con elevada densidad absoluta en plantas de Europa (Maszenan *et al.*, 2000; Eikelboom y Geurkink, 2002). Los resultados sobre la abundancia de dichas bacterias en los meses de verano confirman las observaciones de algunos autores que indican que son capaces de desarrollarse hasta temperaturas cercanas a 35 °C (Seviour y Blackall, 1999; Blackall *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002; McKenzie *et al.*, 2006).

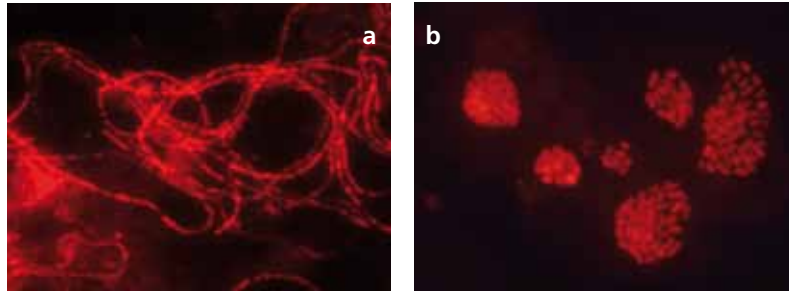
Ca. 'Molinibacter batavus' (**Figura 2d**) y *'Alysiosphaera europaea'* (**Figura 2c**), ambas *Nostocoida limicola II*, han mostrado porcentajes de ocurrencia diferentes, lo que podría confirmar las observaciones de algunos autores sobre la distinta ecofisiología que pueden presentar algunas bacterias filogenéticamente muy relacionadas (Levantesi *et al.*, 2004; Kragelund *et al.*, 2009). *Ca.*

'Molinibacter batavus' no se ha encontrado presente en la EDAR QB (**Figura 4c**), mientras que *Ca. 'Alysiosphaera europaea'*, perteneciente al mismo filo, mostró una ocurrencia del 100% en dicha EDAR. En cambio, *Ca. 'Molinibacter batavus'* se ha mostrado frecuente durante todo el periodo de muestreo en DE (**Figura 4d**), mientras que en CX su mayor frecuencia parece encontrarse más relacionada con invierno y primavera (**Figuras 4a y b**). Las diferencias en el caso de este último organismo podrían tener relación con el régimen de carga másica, que en el caso de DE fue más bajo y constante que en CX. Estas observaciones podrían estar de acuerdo con las encontradas por algunos autores que asocian a *Ca. 'Molinibacter batavus'* con valores de carga másica muy bajos y edades del fango muy avanzadas, además de asociar dicho organismo a episodios de *foaming* (Alonso *et al.*, 2011).

En el caso del género *Isosphaera* (perteneciente al filo *Planctomyces*) (**Figura 3**), su mayor frecuencia de aparición parece observarse principalmente en DE y QB, mientras que en CX se ha encontrado prácticamente ausente. Uno de los resultados interesantes, de la misma forma que para *Trichococcus sp.*, ha sido la identificación de *Isosphaera sp.* como agregados de células en forma de cocos individualizadas en la EDAR DE (**Figura 3b**), lo que confirma las observaciones de Neef (1998) sobre la morfología de esta bacteria en el fango activo. Puesto que los mayores valores de CM y bajos de EF se han dado en CX, dichos resultados podrían dar indicios de una posible influencia de valores contrarios en la abundancia de *Isosphaera sp.* Hasta el momento no constan referencias bibliográficas previas sobre la ecología de este grupo, solo de su filoge-



Figura 3. Bacterias del morfotipo *Nostocoida limicola III* hibridando positivamente con sondas 16S rDNA. Epifluorescencia, 1000x: (a) filamentos de *Isoosphaera sp.*, perteneciente a la EDAR QB; y (b) agregados bacterianos de *Isoosphaera sp.*, perteneciente a la EDAR DE.



nia y morfología en el fango activo (Liu *et al.*, 2000; Liu y Sevir, 2001).

El caso contrario ha sido observado en *Nostocoida limicola II* (filo *Chloroflexi*), el cual ha mostrado su mayor frecuencia de aparición principalmente en CX (**Figura 2b**), sugiriendo que probablemente se encuentre influenciada por elevados valores de CM y bajos de EF. En el caso de *Ca. 'Alysiosphaera europaea'*, las conclusiones serían similares a las encontradas para *Isoosphaera sp.*, es decir, la mayor frecuencia observada en QB y DE podrían dar indicios de una relación con bajos valores de CM y elevados de EF. Dichas asociaciones deberán ser consideradas orientativas, siendo necesarios estudios concluyentes basados en técnicas multivariantes de ordenación e interpretación ambiental, tal cual señalan algunos autores (Ramette, 2007; Zornoza, 2015).

Nostocoida limicola II (filo *Chloroflexi*), *Ca. 'M. batavus'*, *Ca. 'A. europaea'* y *T. japonica*, pertenecientes al morfotipo *Nostocoida limicola II*, han sido asociados con valores altos del IVF, siendo capaces de causar episodios de *bulking* y *foaming* (Eikelboom, 2006). Basándose en ello y en las observaciones sobre las diferencias observadas en la frecuencia de aparición de *Nostocoida limicola II* y posiblemente la relación con

las variables de control de proceso, parece lógico concluir que su identificación mediante microscopía convencional durante dichos episodios se mostraría ambigua y confusa en el intercambio de experiencias entre responsables de planta, pudiendo conducir erróneamente a la toma de decisiones para su control. Sin embargo, la elevada especificidad que ofrece la identificación mediante la técnica FISH, permitirá al responsa-

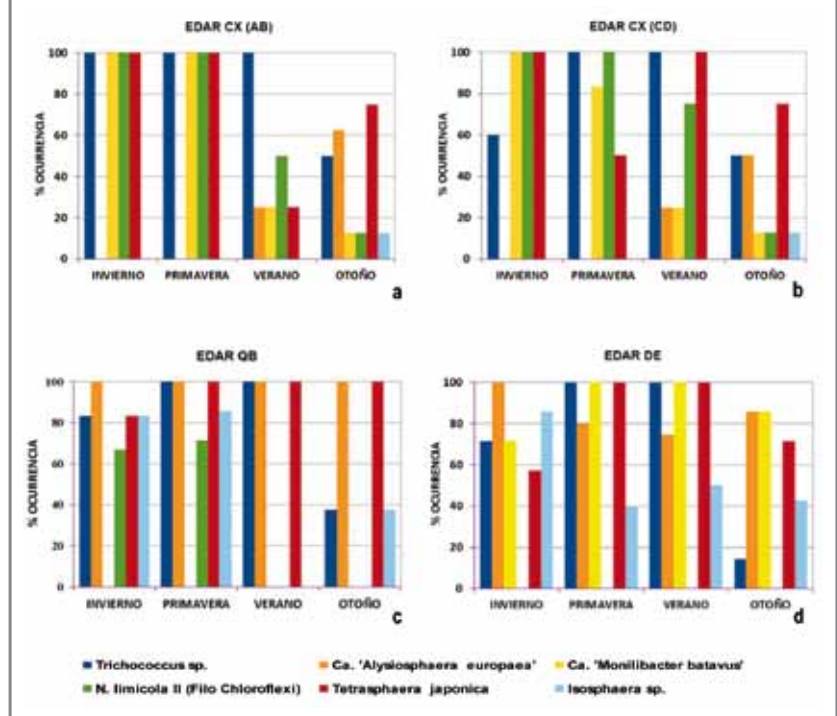
ble de planta conocer exactamente el organismo causante del episodio y, por tanto, acceder a los últimos conocimientos sobre su ecofisiología para tomar las decisiones más acertadas, y de esta forma poder controlar el organismo sin comprometer la sostenibilidad de la instalación y la eficiencia energética.

5. Conclusiones

Los resultados sobre la identificación de microorganismos filamentosos descritos como *Nostocoida limicola* permiten observar que:

- Los morfotipos *Nostocoida limicola* están constituidos por microorganismos filamentosos e individuales de diversa identidad filogenética y variedad fisiológica, dificultando la aplicación de métodos generales para el control de las bacterias asociadas a los problemas de separación de sólidos en sistemas de fangos activos.

Figura 4. Frecuencia de aparición de las bacterias *Nostocoida limicola* durante el estudio: (a) EDAR CX (AB); (b) EDAR CX (CD); (c) EDAR QB; y (d) EDAR DE.



- Desde el punto de vista de la reducción o eliminación del *foaming* o *bulking*, la identificación del morfotipo filamentoso *Nostocoida limicola II* a través de la técnica convencional sería inadecuada para la posterior toma de decisiones en planta, siendo la técnica FISH la más adecuada en estos casos.

- Los microorganismos filamentosos *Isoosphaera sp.* y *Ca. 'Allysiosphaera europaea'* podrían estar influenciados por valores bajos de carga másica y altos de edad del fango, siendo contrario en el caso de *Nostocoida limicola II* (filo *Chloroflexi*). Dicha relación deberá ser demostrada en posteriores estudios a partir de técnicas multivariantes de ordenación e interpretación ambiental.

6. Agradecimientos

Este estudio forma parte del proyecto de investigación 'Estudio integrado del proceso de fangos activos', financiado por la Entidad Pública de Saneamiento de Aguas Residuales de la Comunidad Valenciana (EPSAR). Los autores agradecen la colaboración de las empresas de explotación Avsa-Egevasa, DAM, Facsa y OMS-Saccede.

Bibliografía

- [1] Amann, R.I. (1995). In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. *Molecular Microbial Ecology Manual* 3.3.6: 1-15.
- [2] Alonso, J.L.; Morenilla, J.; Bernácer, I.; Lloret, R.; Cuesta, G.; Ramírez, G. (2009) Manual de técnicas avanzadas para la identificación y control de bacterias filamentosas. EPSAR-Generalitat Valenciana.
- [3] Alonso, J.L.; Rodríguez, E.; Infante, P.; Ciriero, E.; Serra, M.C.; Huguet, A. (2011). Espumas biológicas generadas por *Candidatus Monilibacter* en la EDAR Empuriabrava. *Tecnología del Agua*, núm. 332, págs. 56-69
- [4] Andújar, A.B.; Zornoza, A.; Lledias, M.; Alonso, J.L. (2013). Microscopía convencional versus FISH en la identificación y abundancia de los morfotipos filamentosos 0803, 0914 y 0092 en fangos activos. *Tecnoaqua*, núm. 4, págs. 60-79.
- [5] Beer, M.; Seviour, E.M.; Kong, Y.; Cunningham, M.; Blackall, L.L.; Seviour, R.J. (2002). Phylogeny of the filamentous bacterium Eikelboom Type 1851, and design and application of a 16S rRNA targeted oligonucleotide probe for its fluorescence in situ identification in activated sludge. *FEMS Microbiology Letters*, núm. 207, págs. 179-183.
- [6] Björnsson, L.; Hugenhtotz, P.; Tyson, G.W.; Blackall, L.L. (2002). Filamentous *Chloroflexi* (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. *Microbiology*, núm. 148, págs. 2.309-2.318.
- [7] Blackall, L.L.; Hayward, A.; Pettigrew, A.; Greenfield, P. (1985). Biological foam and scum formation in activated sludge treatment plants. In 11th Federal Convention, Australian Water and Wastewater Association, págs.338-345.
- [8] Blackall, L.L.; Seviour, E.M.; Bradford, D.; Rossetti, S.; Tandoi, V.; Seviour, R. J. (2000). *Candidatus Nostocoida limicola*, a filamentous bacterium from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, núm. 50, págs.: 703-709.
- [9] Buali, A.M.; Horan, N.J. (1989). Variable morphology in certain filamentous bacteria and implication of this for theories of activated sludge bulking. *Environmental Technology Letters*, núm. 10, págs. 941-950.
- [10] Cyrus, Z.; Sladka, A.I. (1970). Several interesting organisms present in activated sludge. *Hydrobiologia*, núm. 35, págs. 383-396
- [11] Eikelboom, D.H. (1975) Filamentous organisms observed in activated sludge. *Water Research*, núm. 9, págs. 365-388.
- [12] Eikelboom, D.H.; van Buijsen, H.J.J. (1983). *Microscopic sludge investigation manual*. 2nd Edition. Delft: TNO Research Institute of Environmental Hygiene.
- [13] Eikelboom, D.H. (2000) *Process control of activated sludge plants by microscopic investigation*. IWA Publishing. London
- [14] Eikelboom, D.H.; Geurkink, B. (2002). Filamentous micro-organisms observed in industrial activated sludge plants. *Water Science and Technology*, núm. 46, págs. 535-542.
- [15] Eikelboom, D.H. (2006) *Identification and control of filamentous microorganisms in industrial wastewater treatment plants*. London, UK: IWA Publishing.
- [16] Farquhar G.J.; Boyle W. (1971). Occurrence of filamentous micro-organisms in activated sludge. *Journal Water Pollution Control Federation*, núm. 43, págs. 779-798.
- [17] Giovannoni, S.J.; Schabtach, E.; Castenholz, R.W. (1987). *Isoosphaera pallida* gen. and comb. nov., a gliding, budding eubacterium from hot springs. *Archives of Microbiology*, núm. 147, págs. 276-284.
- [18] Janssen, P.H.; Evers, S.; Rainey, F.A.; Weiss, N.; Ludwig, W.; Harfoot, C.G.; Schink, B. (1995). *Lactosphaera* gen. nov., a new genus of lactic acid bacteria, and transfer of *Ruminococcus pasteurii* Schink 1984 to *Lactosphaera pasteurii* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, núm. 45 (3), págs. 565-571.
- [19] Jenkins, D.; Richard, M.G.; Daigger, G.T. (2004). *Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming and other solids separation problems*. 3rd Edition. Lewis Publishers.
- [20] Kragelund, C.; Nielsen, J.L.; Thomsen, T.R.; Nielsen, P.H. (2005). Ecophysiology of the filamentous *Alphaproteobacterium Meganema perideroedes* in activated sludge. *FEMS Microbiology Ecology*, núm. 54, págs. 111-122
- [21] Kragelund, C.; Kong, Y.; van der Waarde, J.; Thelen, K.; Eikelboom, D.; Tandoi, V.; Thomsen, T.R.; Nielsen, P.H. (2006). Ecophysiology of different filamentous *Alphaproteobacteria* species from industrial waste water treatment plants. *Microbiology*, núm. 152, págs.3.003-3.012.
- [22] Kragelund, C.; Levantesi, C.; Borger, A.; Thelen, K.; Eikelboom, D.; Tandoi, V.; Kong, Y.; van der Waarde, J.; Krooneman, J.; Rossetti, S.; Thomsen, T.R.; Nielsen, P.H. (2007). Identity, abundance and ecophysiology of filamentous *Chloroflexi* species from activated sludge treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology*, núm. 59, págs. 671-682.
- [23] Kragelund, C.; Müller, E.; Schade, M.; Nguyen, H.; Lemmer, H.; Seviour, R.J.; Nielsen, P.H. (2009). *FISH Handbook for Biological Wastewater Treatment* (Nielsen, P.H.; Daims, H.; Lemmer, H. eds). IWA Publishing, London, págs. 36-68.
- [24] Levantesi, C.; Beimfohr, C.; Geurkink, B.; Rossetti, S.; Thelen, K.; Krooneman, J.; Snaidr, J.; van der Waarde, J.; Tandoi, V. (2004). Filamentous *Alphaproteobacteria* associated with bulking in industrial wastewater treatment plants. *Systematic and Applied Microbiology*, núm. 27, págs. 716-727.
- [25] Liu, J.R.; Burrell, P.; Seviour, E.M.; Soddell, J.A.; Blackall, L.L.; Seviour, R.J. (2000). The filamentous bacterial morphotype *Nostocoida limicola I* contains at least two previously described genera in the low G+C Gram positive bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, núm. 23, págs. 528-534.
- [26] Liu, J.R.; Seviour, R.J. (2001). Design and application of oligonucleotide probes for fluorescent in situ identification of the filamentous bacterial morphotype *Nostocoida limicola* in activated sludge. *Environmental Microbiology*, núm. 3(9), págs. 551-560.
- [27] Liu, J.R.; McKenzie, C.A.; Seviour, E.M.; Webb, R.I.; Blackall, L.L.; Saint, C.P.; Seviour, R.J. (2001). Phylogeny of the filamentous bacterium *Nostocoida limicola III* from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, núm. 51, págs. 195-202.
- [28] Liu, J.R.; Tanner, R.S.; Schumann, P.; Weiss, N.; McKenzie, C.A.; Janssen, P.H.; Seviour, E.M.; Lawson, P.A.; Allen, T.D.; Seviour, R.J. (2002). Emended description of the genus *Trichococcus*, description of *Trichococcus collinsii* sp. nov., and reclassification of *Lactosphaera pasteurii* as *Trichococcus pasteurii* comb. nov. and of *Ruminococcus palustris* as *Trichococcus palustris* comb. nov. in the low-G+C gram-positive bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, núm. 52, págs. 1.113-1.126.
- [29] Madoni, P.; Davoli, D.; Gibin, G. (2000). Survey of filamentous microorganisms from bulking and foaming activated-sludge plants in Italy. *Water Research*, núm. 34(6), págs. 1.767-1.772.
- [30] Maszenan, A.M.; Seviour, R.J.; Patel, B.K.C.; Schumann, P.; Burghardt, J.; Tokiwa, Y.; Stratton, H.M. (2000). Three isolates of novel polyphosphate-accumulating Gram-positive cocci, obtained from activated sludge, belong to a new genus, *Tetrasphaera* gen. nov., and description of two new species, *Tetrasphaera japonica* sp. nov. and *Tetrasphaera australiensis* sp. nov. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microb.*, núm. 50, págs. 593-603.
- [31] Mckenzie, C.M.; Seviour E.M.; Schumann, P.; Maszenan, A.M.; Liu, J.R.; Webb, R.I.; Monis, P.; Saint, C.P.; Steiner, U.; Seviour, R.J. (2006). Isolates of *Candidatus Nostocoida limicola* Blackall et al. 2000 should be described as three novel species of the genus *Tetrasphaera*, as *Tetrasphaera jenkinsii* sp. nov., *Tetrasphaera vanveenii* sp. nov. and *Tetrasphaera veronensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, núm. 56, págs. 2.279-2.290.
- [32] Metcalf and Eddy Inc. (2003) *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*. Madrid. McGraw-Hill (4th Edition).
- [33] Mielczarek, A.T.; Kragelund, C.; Eriksen, P.S.; Nielsen, P.H. (2012). Population dynamics of filamentous bacteria in Danish wastewater treatment plants with nutrient removal. *Water Research*, núm. 46, págs. 3.181-3.195.



- [34] Mulder, E.G.; Antheunisse, J.; Crombach, W.H.J. (1971). Microbial aspects of pollution in the food and dairy industries, págs 71-89. En *Microbial aspects of pollution*: edited by Sykes G.; Skinner F.A. Society for Applied Bacteriology symposium series. Nº 1. Academic Press, London.
- [35] Neef, A.; Amann, R.; Schlesner, H.; Schleifer, K.H. (1998). Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology*, núm. 144, págs. 3.257-3.266.
- [36] Nielsen, P.H.; Kragelund, C.; Seviour, R.J.; Nielsen, J.L. (2009). Identity and ecophysiology of filamentous bacteria in activated sludge. *FEMS Microbiology Reviews*, núm. 33, págs. 969-998.
- [37] Ramette, A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, núm. 62, págs. 142-160.
- [38] Richard, M.G.; Hao, O.; Jenkins, D. (1985). Growth kinetics of *Sphaerotilus* species and their significance in activated sludge bulking. *Journal Water Pollution Control Federation*, núm. 57, págs. 68-81.
- [39] Rodríguez, E.; Isac, L.; Fernández, N.; Zornoza, A.; Mas, M. (2008). Identificación de bacterias filamentosas en EDAR industriales. *Tecnología del Agua*, núm. 303, págs. 56-64
- [40] Romera, V.; Zornoza, A.; Alonso, J.L. (2013). Identification and abundance of *Thiothrix* in WWTPs. V International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology. *BiomicroWorld 2013*. Madrid.
- [41] Schade, M.; Beimfohr, C.; Lemmer, H. (2002). Phylogenetic and physiological characterization of a *Nostocoida limicola* like organism isolated from activated sludge. *Water Science Technology*, núm. 46 (1-2), págs. 91-97.
- [42] Scheff, G.; Salcher, O.; Lingens, F. (1984). *Trichococcus flocculiformis* gen. nov., sp. nov. A new gram positive filamentous bacteria isolated from activated sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, núm. 19, págs. 114-119.
- [43] Seviour, E.M.; Blackall, L.L.; Christensson, C.; Hugenholtz, P.; Cunningham, M.A.; Bradford, D.; Stratton, H.M.; Seviour, R.J. (1997). The filamentous morphotype Eikelboom type 1863 is not a single genetic entity. *Journal of Applied Microbiology*, núm. 82, págs. 411-421.
- [44] Seviour, R.J.; Blackall, L.L. (1999). *The Microbiology of Activated Sludge*. 2nd Edition. Chapman & Hall. London.
- [45] Seviour, R.J.; Maszenan, A.M.; Soddell, J.A.; Tandoi, V.; Patel, B.K.C.; Kong, Y.; Schumann, P. (2000). Microbiology of the G-Bacteria in activated sludge minireview. *Environmental microbiology*, núm. 2, págs. 581-593.
- [46] Seviour, R.J.; Liu, J.R.; Seviour, E.M.; McKenzie, C.A.; Blackall, L.L.; Saint, C.P. (2002). The *Nostocoida limicola* story: resolving the phylogeny of this morphotype responsible for bulking in activated sludge. *Water Science Technology*, núm. 46(1-2).
- [47] Seviour, E.M.; Eales, K.L.; Izzard, L.; Beer, M.; Carr, E.L.; Seviour, R.J. (2006). The in situ physiology of *Nostocoida limicola II*, a filamentous bacterial morphotype in bulking activated sludge, using fluorescence in situ hybridization (FISH) and microautoradiography (MAR). *Water Science Technology*, núm., 54, págs. 47-53.
- [48] Seviour, R.J.; Kragelund, C.; Kong, Y.; Eales, K.; Nielsen, J.L.; Nielsen, P.H. (2008). Ecophysiology of the *Actinobacteria* in activated sludge systems. *Antonie van Leeuwenhoek*, núm. 94, págs. 21-23.
- [49] Sladka, A.; Ottova, V. (1973). Filamentous organisms in activated sludge. *Hydrobiologia*, núm. 43 (3-4), págs. 285-299.
- [50] Snaidr, J.; Beimfohr, C.; Levantesi, C.; Rossetti, C.; van der Waarde, J.; Geurkink, B.; Eikelboom, D.; Lemaitre, M.; Tandoi, V. (2002). Phylogenetic analysis and in situ identification of *Nostocoida limicola* like filamentous bacteria in activated sludge from industrial wastewater treatment plants. *Water Science Technology*, núm. 46 (1-2), págs. 99-104.
- [51] Tandoi, V.; Jenkins, D.; Wanner, J. (2006). Activated sludge separation problems. Theory, control measures, practical experience. IWA Publishing. London.
- [52] Van Veen, W.L. (1973). Bacteriology of activated sludge, in particular the filamentous bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, núm. 39, págs. 189-205.
- [53] Wanner, J.; Ruzicková, I.; Jetmarová, P.; Krhutková, O.; Paraniaková, J. (1998). A national survey of activated sludge separation problems in the Czech Republic: filaments, floc characteristics and activated sludge metabolic properties. *Water Science Technology*, núm. 37(4-5), págs. 271-279.
- [54] Zornoza, A.; Alonso, J.L.; Cuesta, G.; Soler, A. (2008). Identificación y caracterización de bacterias filamentosas en biorreactores de EDAR del sector petroquímico. V Jornadas de Transferencia de Tecnología sobre Microbiología del Fango Activo. Sevilla.
- [55] Zornoza, A. (2015). Metodología para la búsqueda de microorganismos bioindicadores en fangos activos: la desesperación en la búsqueda del modelo. Curso teórico-práctico 'El papel de los protistas en los procesos de depuración de aguas residuales'. Sevilla.

DESCUBRA MÁS
ARTÍCULOS TÉCNICOS Y
OTRAS INFORMACIONES EN

WWW.TECNOAQUA.ES