(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓNEN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
15 de abril de 2010 (15.04.2010)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/040872 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
G01N 33/18 (2006.01) *C02F 3/12* (2006.01)
G09B 25/02 (2006.01) *C12Q 1/06* (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2009/000488

(22) Fecha de presentación internacional:
6 de octubre de 2009 (06.10.2009)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200802851 8 de octubre de 2008 (08.10.2008) ES

(71) Solicitantes *(para todos los Estados designados salvo US)*: **UNIVERSIDAD POLITECNICA DE VALENCIA** [ES/ES]; CTT-Edif.6G, Camino de Vera s/n, E-46022 Valencia (ES). **UNIVERSIDAD DE VALENCIA** [ES/ES]; Universidad de Valencia, OTRI, Avda. Blasco Ibanez, 13 2° nivel, E-46010 Valencia (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes *(para US solamente)*: **ALONSO MOLINA, Jose Luis** [ES/ES]; Universidad Politecnica de Valencia, CTT-Edif. 6G, Camino de Vera s/n, E-46022 Valencia (ES). **BORRÁS FALOMIR, Luís** [ES/ES]; Universidad de Valencia, OTRI, Avda. Blasco Ibáñez, 13 2° nivel, E-46010 Valencia (ES). **FERRER POLO, José** [ES/ES]; Universidad Politecnica de Valencia, CTT-Edif. 6G, Camino de Vera s/n, E-46022 Valencia (ES).

(74) Mandatario: **UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**; CTT-Edif. 6G, Camino de Vera s/n, E-46022 Valencia (ES).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

— *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))*

— *con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))*

(54) **Title**: METHOD FOR DETERMINING THE CONTRIBUTION OF BIOMASS TO COD

(54) **Título** : MÉTODO PARA DETERMINAR LA CONTRIBUCIÓN DE LA BIOMASA A LA DQO

(57) **Abstract**: The method comprises the application of molecular microbiological techniques of *in situ* hybridation (FISH), staining with DAPI and cell viability to determine the contribution to the chemical oxygen demand of the specific groups of bacteria present in biological waste-water purification processes (heterotrophic bacteria, autotrophic bacteria and polyphosphate-accumulating bacteria, PAO). This method permits the calibration of the mathematical methods of activated sludges in a direct manner without needing to have recourse to optimisation of the results, thereby reducing the uncertainty when determining the calibration parameters for a specific system of waste water treatment.

(57) **Resumen**: El método comprende la aplicación de las técnicas microbiológicas moleculares de hibridación *in situ* (FISH), tinción con DAPI y viabilidad celular, para determinar la contribución a la demanda química de oxígeno (DQO), de los grupos específicos de bacterias presentes en procesos de depuración biológica de aguas residuales (bacterias heterótrofas, autótrofas y bacterias acumuladoras de poli-fosfatos, PAO). Este método permite llevar a cabo la calibración de los métodos matemáticos de fangos activados de una forma directa, y sin la necesidad de recurrir a una optimización de los resultados, reduciendo así la incertidumbre a la hora de hallar los parámetros de calibración para un determinado sistema de tratamiento de aguas residuales.

WO 2010/040872 A1

Método para determinar la contribución de la biomasa a la DQO.

El método comprende la aplicación de las técnicas microbiológicas moleculares de hibridación *in situ* (FISH), tinción con DAPI y viabilidad celular, para determinar la contribución a la demanda química de oxígeno (DQO), de los grupos específicos de bacterias presentes en procesos de depuración biológica de aguas residuales (bacterias heterótrofas, autótrofas y bacterias acumuladoras de poli-fosfatos, PAO). Este método permite llevar a cabo la calibración de los métodos matemáticos de fangos activados de una forma directa, y sin la necesidad de recurrir a una optimización de los resultados, reduciendo así la incertidumbre a la hora de hallar los parámetros de calibración para un determinado sistema de tratamiento de aguas residuales.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Los principales objetivos en la explotación de las estaciones depuradoras de aguas residuales son, el cumplimiento de los límites de vertido marcados por la legislación y la minimización del consumo de energía. Esto implica el correcto diseño de las actuales estaciones depuradoras de aguas residuales y, en muchos casos, el incremento del rendimiento de muchas de las estaciones depuradoras de aguas residuales ya construidas para adaptarlas a las actuales necesidades. La gran cantidad de factores que influyen en el funcionamiento de estos procesos hace necesario un estudio exhaustivo de cada caso, teniendo en cuenta tanto las características del agua residual a tratar como el tipo de proceso de depuración para el cual ha sido diseñada la estación depuradora de aguas residuales. Este tipo de estudios permite diagnosticar el funcionamiento de plantas existentes y optimizar su operación, adecuando el proceso de depuración al agua residual afluente. Sin embargo, dada la alta complejidad de los procesos biológicos involucrados, no es posible realizar estos estudios sin la ayuda de un modelo matemático que sea capaz de representar fielmente las transformaciones que se producen en una estación depuradora de aguas residuales.

En la actualidad, existe una necesidad en la simplificación de los modelos y protocolos de simulación de los diferentes sistemas de tratamiento de aguas residuales y puede constituir uno de los aspectos con mayor potencial de desarrollo en el futuro para la mejora en el tratamiento de aguas residuales.

De todos los modelos existentes en la bibliografía, los más ampliamente utilizados y aceptados por la comunidad científica son los propuestos por la IWA (del inglés International Water Association), en concreto los modelos ASM1 y ASM2d (Henze *et al.*, (2000). IWA Scientific and Technical Report No. 9, IWA Publishing, London, UK).

El elevado número de parámetros que presentan estos modelos, más de 60 parámetros, y el alto nivel de correlación existente entre ellos, hace especialmente difícil la obtención de todos ellos para un determinado sistema. Por este motivo, se ha dedicado un gran esfuerzo para encontrar un método de obtener dichos parámetros con la mínima incertidumbre.

La conversión de los datos microbiológicos en datos utilizables en los modelos de procesos biológicos es uno de los puntos débiles que tradicionalmente se han asociado a estos modelos. Este obstáculo queda superado mediante la invención propuesta. La técnica desarrollada permite cuantificar de forma precisa los microorganismos de importancia en estos procesos y los parámetros que hay que cumplimentar en los modelos matemáticos para realizar un análisis del proceso con un simulador matemático, y por tanto, estar en condiciones de actuar sobre problemas en los procesos biológicos de depuradoras con una premura de tiempo de la que hasta ahora no se disponía.

En la presente invención se provee de un método que, mediante la combinación de análisis químicos y métodos microbiológicos moleculares, permite obtener, de una forma directa, la contribución a la DQO, de cada uno de los grupos bacterianos que tienen en cuenta los modelos matemáticos citados. Mediante este método, se reduce la incertidumbre en el cálculo de parámetros, y se evita la necesidad de utilizar métodos de optimización para la obtención de los mismos. Esta metodología ha sido desarrollada y validada en sistemas de fangos activados con eliminación

biológica de fósforo.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

El método de la presente invención comprende la aplicación de las técnicas microbiológicas moleculares de hibridación *in situ* (FISH), tinción con DAPI y pruebas de viabilidad celular, para determinar la contribución a la demanda química de oxígeno (DQO), de los grupos específicos de bacterias presentes en procesos de depuración biológica de aguas residuales (bacterias heterótrofas, autótrofas y bacterias acumuladoras de poli-fosfatos, PAO) fundamentalmente. El método combina los análisis químicos convencionales de DQO y las técnicas microbiológicas. Este método permite llevar a cabo la calibración de los métodos matemáticos de fangos activados de una forma directa, y sin la necesidad de recurrir a una optimización de los resultados, reduciendo así la incertidumbre a la hora de hallar los parámetros de calibración para un determinado sistema de tratamiento de aguas residuales.

La presente invención tiene un objetivo claro con un gran interés de aplicación: el desarrollo de un método para la estimación de las poblaciones bacterianas con interés en los procesos de tratamiento biológico de aguas residuales, y su parametrización de forma que pueda ser utilizado en los modelos matemáticos que se emplean típicamente para diseñar estos procesos y para analizar su funcionamiento. Este tipo de procesos biológicos son los más implementados en el tratamiento de aguas residuales urbanas (Estaciones Depuradoras de Agua Residual, EDAR), aun cuando el conocimiento sobre la operación de los mismos sigue teniendo lagunas importantes, en especial en lo que se refiere a la dinámica de poblaciones microbianas, de vital importancia a la hora de justificar los resultados operativos de las EDAR.

Los modelos matemáticos capaces de simular y predecir situaciones de operación en las plantas de tratamiento de aguas residuales están altamente extendidos. Estos modelos son de mucha utilidad, pero su principal inconveniente reside en el gran número de parámetros a calibrar con ensayos reales. Algunos de estos parámetros no pueden ser calibrados analíticamente. Por ejemplo, no será posible determinar la

cantidad de biomasa eliminadora de fósforo, X_{PAO}, porque no es posible realizar un ensayo en laboratorio inhibiendo completamente el resto de bacterias. En la presente invención se describe un método capaz de cuantificar las distintas poblaciones microbianas combinando técnicas moleculares como la tinción con DAPI, y la hibridación *in situ*, FISH, con el que se puede obtener el porcentaje en área (o volumen o masa) de bacterias de un tipo específico en la biomasa de un reactor. Mediante el uso de diversas técnicas será posible convertir estos porcentajes másicos de contenido de bacterias específicas, en unidades de DQO por mililitro, unidades utilizadas mayoritariamente en los modelos matemáticos de fangos activos.

El método propuesto supone una importante mejora en la certidumbre del proceso de calibración del modelo matemático, ya que se reduce el número de variables desconocidas hasta el punto de que no es necesaria una optimización de los errores de las soluciones matemáticas, sino que se puede realizar un cálculo directo de los parámetros del modelo. Esto evita la obtención de resultados que pueden tener sentido matemático pero no biológico.

La buena correlación de los datos obtenidos valida completamente la metodología y la coloca en disposición de ser utilizada masivamente en plantas de tratamiento de aguas residuales a escala real.

La combinación de las técnicas microbiológicas moleculares, el análisis químico de las muestras de agua y las ecuaciones que incorporan los modelos matemáticos existentes, supone un gran avance en cuanto a la forma de utilizar estos recursos. La incorporación de datos obtenidos directamente de medidas microbiológicas en la ecuación del balance de DQO, supone una importante reducción en el número de parámetros a determinar en el modelo matemático ASM2. De otra forma, estos parámetros (X_H, X_A, X_{PAO} y X_I) habrían de ser estimados mediante métodos matemáticos de optimización, reduciendo considerablemente la certidumbre del proceso de calibración del modelo. El parámetro X_H hace referencia al porcentaje de bacterias heterótrofas, X_A hace referencia al porcentaje de bacterias autótrofas, X_{PAO} hace referencia al porcentaje de bacterias acumuladoras de poli-fosfatos y X_I hace referencia al porcentaje

de bacterias no viables en la muestra.

Todas las bacterias presentes en los sistemas de tratamiento de aguas residuales pueden ser identificadas mediante la técnica de hibridación *in situ* (FISH). En la presente invención, todos los grupos bacterianos (bacterias heterótrofas, autótrofas y bacterias acumuladoras de poli-fosfatos, PAO) tienen el mismo peso específico en la determinación de la DQO.

En este sentido, el principal aspecto de la presente invención es un método para determinar la contribución de la biomasa al balance de DQO en agua que comprende:

a. obtener una muestra de agua,
b. determinar los porcentajes de los grupos bacterianos y materia inerte de la muestra obtenida en (a) mediante técnicas microbiológicas moleculares,
c. determinar los siguientes parámetros de la muestra de agua obtenida en (a); DQO total (DQO_T), DQO soluble (DQO_{SOL}), DQO suspendida (DQO_{SUSP}), DBO límite total (DBO_{LT}), DBO límite soluble ($DBO_{L\ SOL}$), tiempo de retención de sólidos (SRT) y tiempo de resistencia hidráulico (HRT),
d. determinar el balance de DQO utilizando los parámetros obtenidos en (c) y
e. determinar la contribución de cada grupo bacteriano y materia inerte según (b) al balance de DQO calculado en (d).

El término "biomasa" según se utiliza en la presente invención hace referencia a la materia total de microorganismos presentes en una muestra de agua. Estos microorganismos pueden ser viables o no viables.

El término "materia inerte" se refiere a las bacterias no viables de la muestra de agua.

La determinación de los porcentajes de los grupos bacterianos y materia inerte de la muestra de agua se lleva a cabo mediante técnicas microbiológicas moleculares. Las técnicas microbiológicas moleculares de la presente invención están basadas en la identificación de los grupos

bacterianos mediante el empleo de técnicas de biología molecular. Las técnicas de biología molecular que se pueden llevar a cabo deben permitir la obtención de datos y/o imágenes mediante los cuales se pueda estimar la representación de los diferentes grupos bacterianos. Así pues, para ello se pueden emplear técnicas tradicionales de cultivo y/o técnicas de biología molecular como, marcaje con sondas específicas acopladas a fluoróforos (técnica FISH; *Fluorescence In Situ Hybridization*), marcaje con 4,6-diamidino-2-fenlindol (DAPI), detección mediante anticuerpos, PCR, secuenciación de ADN, microscopía óptica, de epifluorescencia o confocal sin excluir otras técnicas de biología molecular que permitan identificar y determinar el porcentaje de grupos bacterianos de una muestra de agua. Si se procede a obtener imágenes, su análisis se puede llevar a cabo por cualquier procedimiento manual o informatizado que permita calcular las áreas ocupadas por cada uno de los grupos bacterianos que se desee determinar.

La determinación de la DQO total (DQO_T), DQO soluble (DQO_{SOL}), DQO suspendida (DQO_{SUSP}), DBO límite total (DBO_{LT}), DBO límite soluble ($DBO_{L\ SOL}$), se puede llevar a cabo según el *Standard methods for the examination of water and wastewater* o mediante cualquier otra técnica analítica que permita su determinación.

El tiempo de retención de sólidos (SRT) y tiempo de resistencia hidráulico (HRT) se pueden calcular mediante. El cálculo del HRT y SRT es directo: HRT= Volumen/Caudal, SRT = (volumen x sólidos suspendidos (SS) en el reactor)/(caudal de purga x SS en la purga). Los SS se analizan según el *Standard methods for the examination of water and wastewater*, sección 2540 D.

El término "balance de DQO" hace referencia a toda la DQO generada en el sistema acuático. El valor de la DQO puede aumentar por un nuevo aporte de agua, permanecer invariable, aumentar en el interior del reactor de fangos activados o disminuir. En definitiva, el balance de DQO es el estudio de los factores que intervienen en el proceso de depuración, llevado a cabo por los diferentes grupos de bacterias, para tratar de prever su evolución.

Según una realización preferida del método anterior, la determinación del balance de DQO del paso (d) y la determinación de la contribución de cada grupo bacteriano y materia inerte al balance de DQO se llevan a cabo mediante una ecuación que comprende,

$$X_H + X_A + X_{PAO} + X_I + X_{I0}\frac{SRT}{HRT} = DQO_{SUSP}$$

Donde los parámetros X_H, X_A y X_{PAO} representan la DQO debida a la presencia de bacterias heterótrofas, autótrofas y PAO, respectivamente. El parámetro X_I representa la materia suspendida inerte (también en unidades de DQO), debida principalmente a la muerte de las bacterias heterótrofas, autótrofas y PAO. El parámetro $X_{I0}\cdot(SRT/HRT)$ se refiere a la materia suspendida inerte que entra con el agua afluente al reactor del sistema de depuración. Los parámetros DQO_{SUSP}, SRT y HRT se calculan según lo descrito anteriormente.

Por el término "agua que entra a un sistema" tal como se utiliza en la presente invención, se entiende el agua afluente o entrante a un sistema en el cual se lleva a cabo un proceso de depuración del agua (por ejemplo en un reactor de unas instalaciones de depuración de aguas residuales).

X_{I0} es la cantidad de materia inerte suspendida que entra con el agua afluente al sistema. Este parámetro se puede calcular, según el procedimiento tradicional, a partir de la DQO total (DQO_T), DQO soluble (DQO_{SOL}), DBO límite total (DBO_{LT}) y DBO límite soluble ($DBO_{L\,SOL}$) según la siguiente ecuación:

$$X_{I0} = DQO_T - DBO_{LT} - (DQO_{SOL} - DBO_{LSOL})$$

X_H, X_A y X_{PAO} representan la DQO debida a la presencia de bacterias heterótrofas, autótrofas, PAO y materia suspendida inerte, respectivamente. X_{I0} es la DQO debida a la materia suspendida inerte aportada por el agua que entra a un sistema.

Para resolver esta ecuación, es necesario conocer los parámetros X. Sin embargo, no existe ningún método para el cálculo directo de dichos parámetros (el parámetro X_{I0} sí que es calculable mediante el método

descrito en una ecuación anterior). Para obtener los valores de estos parámetros se deben resolver el conjunto de ecuaciones que conforman el modelo matemático (ASM2 en este caso). Esto quiere decir, que se obtienen de una forma indirecta y "ciega". El método que propone esta invención es un método directo y "real", ya que cuantifica directamente las diferentes poblaciones de microorganismos.

En las ecuaciones descritas pueden introducirse parámetros, como por ejemplo, la DQO debida a bacterias GAO (bacterias acumuladoras de glicógeno).

Esta determinación se lleva a cabo asumiendo que todos los grupos bacterianos y materia inerte presentes en la muestra de agua tienen el mismo peso específico en términos de DQO y, por tanto, la contribución de cada uno de ellos será proporcional a su abundancia en la muestra, representada ésta en forma de porcentaje respecto a la masa total o respecto al área analizada en las imágenes adquiridas. Así pues, y a modo de ejemplo, supongamos que el valor del balance de DQO fuese 1000 mg DQO/l, los porcentajes de bacterias heterótrofas y materia inerte tuviesen un valor de 0 y las bacterias autótrofas y PAO representasen un 20% y 80% respectivamente. En este caso particular, el valor de X_A sería 200 mg/l y el valor de X_{PAO} de 800 mg/l.

En una realización más preferida, la muestra de agua es agua residual.

El término agua "residual" se refiere a un tipo de agua que, por haber sido usada, está contaminada con sustancias fecales y orina, procedentes de desechos orgánicos humanos o animales, vertidos industriales u otro tipo de contaminantes.

En una realización aún más preferida, el agua residual procede de la entrada a una instalación donde se lleva a cabo el tratamiento de aguas residuales basado en un sistema de fangos activados. El agua debe proceder de la entrada (agua afluente) al proceso de fangos activados. Los diferentes parámetros que se analizan en la presente invención requieren muestras de agua de origen diferente, así, por ejemplo, la muestra de donde se obtiene la X_{I0} es agua residual afluente. Sobre ésta se realizan

las analíticas descritas para la obtención del parámetro X_{I0}. Para el análisis del resto de parámetros (DQO_{SUSP}, SRT, HRT y X) se requieren muestras del fango (reactor biológico), que es donde se encuentran en su mayor parte las bacterias en el reactor así como mezcla de agua afluente y fango del reactor, también conocido como licor mezcla.

Los sistemas de fangos activados o fangos activos, consisten en un tanque de aireación con fangos activos y otro tanque para la clarificación secundaria. El agua residual afluente entra en el tanque de aireación. El agua clara de la superficie de este tanque pasa al tanque de clarificación secundaria. La mayor parte de los fangos que se han sedimentado en el tanque de clarificación secundaria vuelve al tanque de aireación asegurando así un proceso continuo de depuración biológica con altas tasas de descomposición de materia orgánica (de hasta un 99%). La depuración biológica de aguas residuales en los sistemas de fangos activados se realiza por microorganismos (fundamentalmente bacterias), que descomponen los componentes orgánicos de las aguas residuales. Los aireadores más utilizados en este tipo de sistemas de depuración son los sumergibles y se encargan de suministrar oxígeno para favorecer la acción depuradora de las bacterias aerobias.

En otra realización preferida, la determinación de los porcentajes de los grupos bacterianos y materia inerte comprende:

a. marcar las bacterias de la muestra mediante técnicas FISH, tinción con DAPI y técnicas de viabilidad celular,
b. adquirir imágenes de la fluorescencia emitida por las bacterias marcadas con las técnicas descritas en (a) y
c. determinar las áreas ocupadas por los grupos bacterianos y materia inerte.

Según otra realización más preferida, el marcaje de las bacterias mediante técnicas FISH se lleva a cabo con las sondas SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, con las sondas SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 5 y con las sondas SEQ ID NO: 6 a SEQ ID NO: 8.

En la técnica FISH de la presente invención se utilizan sondas de DNA marcadas con un fluoróforo para detectar los distintos grupos de bacterias.

Las sondas de DNA utilizadas son secuencias específicas de bacterias autótrofas en el caso de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 (de Betaproteobacteria oxidante de amonio y *Nitrobacter* spp respectivamente), de bacterias del dominio Eubacteria en el caso de SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 5 (cebador con secuencias consenso de la mayor parte de *eubacterias*, *Planctomycetales* y *Verrucomicrobiales* respectivamente) y de bacterias acumuladoras de poli-fosfatos (PAO) en el caso de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 (de *Rhizophagus tenuis, Accumulibacter phosphatis y Rhizophagus tenuis* respectivamente).

Para llevar a cabo la hibridación fluorescente *in situ* (FISH; del inglés *Fluorescent In Situ Hybridization*) se utilizan moléculas fluorescentes para localizar genes o fragmentos de DNA. La técnica consiste en preparar secuencias de DNA de una sola hebra, llamadas sondas, que son complementarias de las secuencias de DNA que se quieren marcar y examinar. Estas sondas se marcan con moléculas fluorescentes (TAMRA; tetrametil-rhodamina, fluoresceína, u otras moléculas fluorescentes). Las sondas se hibridan al DNA complementario y, al estar marcadas con moléculas fluorescentes, permiten localizar las bacterias a las que pertenecen esas secuencias específicas. El fluoróforo emite una longitud de onda específica que permite, mediante el uso de un microscopio de fluorescencia con los filtros adecuados, detectar las células marcadas.

El DAPI tiene gran afinidad por el DNA. Este fluoróforo atraviesa la membrana celular y se une al DNA del núcleo de forma inespecífica. Se excita con luz ultravioleta. Mediante la tinción celular con DAPI se marcan todas las células presentes en la muestra de agua. En la presente invención, para llevar a cabo el marcaje de todas las células de una muestra de agua también pueden emplearse otros fluoróforos diferentes al DAPI y que consigan el mismo efecto.

Las técnicas de viabilidad celular son aquellas que permiten determinar el porcentaje másico de bacterias viables (vivas) y no viables (no vivas) en una muestra. En la presente invención se ha empleado el kit L-7012 LIVE/DEAD® *BaclightTM de Molecular Probes* que se basa en la integridad de la membrana celular, de modo que las bacterias con la membrana intacta son clasificadas como viables, y las bacterias con la membrana

dañada como no viables. Las bacterias viables son marcadas con un fluoróroro que emite luz verde y las no viables se marcan con un fluoruro distinto que emite luz roja. Se asumió que el porcentaje másico de bacterias inertes coincidía con el de bacterias no viables. La utilización de este kit para determinar la viabilidad celular no limita el empleo de otras técnicas o kits con los que se consiga la misma información.

La adquisición de imágenes de la fluorescencia emitida por las bacterias marcadas con las técnicas descritas anteriormente se lleva a cabo mediante un sistema de fotografiado capaz de acoplarse al microscopio de fluorescencia. El microscopio de fluorescencia o el microscopio confocal láser, con los filtros adecuados según los fluorocromos utilizados, permite visualizar las células marcadas que son excitadas con la longitud de onda adecuada, de modo que se pueden usar todas las sondas en una misma muestra y seleccionar las longitudes de onda de emisión de los respectivos fluoróforos que marcan los grupos bacterianos, de este modo se obtienen imágenes con solapamiento de marcaje en una misma muestra que permite determinar los porcentajes de cada grupo de bacterias.

La determinación de las áreas ocupadas por los grupos bacterianos y materia inerte se lleva a cabo mediante cualquier procedimiento manual o informatizado que permita calcular las áreas ocupadas por cada uno de los grupos bacterianos y la materia inerte que se desee determinar.

El procedimiento informatizado consiste en un programa informático que permite el procesamiento y análisis de las imágenes en los siguientes pasos:

a. Adquisición de las imágenes en el programa de procesado y análisis de imágenes. El software permite el tratamiento de las imágenes basándose no sólo en la apariencia de las imágenes, sino también en la información numérica que en ella se contiene, la información de cada píxel individual. Se deben tratar de forma independiente los diferentes canales (rojo, verde o azul). Cada color corresponde a un grupo bacteriano (rojo y verde) o células totales de la muestra (azul).

b. binarización de la imagen. Se debe convertir la imagen en blanco y negro, de forma que la señal positiva está representada por los píxeles

blancos, y la negativa o "background" por los píxeles negros. De esta forma el software es capaz de cuantificar los píxeles correspondientes a cada una de las clases, "blanco" o "negro" y por tanto, sus áreas correspondientes.

Según otra realización más preferida, la determinación de las áreas ocupadas por los grupos bacterianos y materia inerte se lleva a cabo analizando las imágenes de, al menos, 20 campos por muestra.

El término "campo" se refiere a una región del portaobjetos en el que se ha depositado la muestra marcada mediante alguna de las técnicas descritas anteriormente. Esta región está definida por los aumentos a los que se realiza el visionado y el tamaño de la imagen que adquiere. A mayor número de campos analizados, más cercano será el valor del porcentaje de superficie de cada uno de los grupos bacterianos al porcentaje real.

En la presente invención, la determinación de los porcentajes de área ocupada por las bacterias autótrofas y por las bacterias PAO se lleva a cabo de forma directa ya que cada uno de los dos grupos bacterianos está marcado mediante sondas específicas FISH, tal como se ha descrito anteriormente. Mediante la técnica FISH, se obtuvo el porcentaje de área ocupado por bacterias autótrofas frente al área ocupada por las bacterias del dominio *Eubacteria*. Con la tinción con DAPI se corrigió el porcentaje obtenido mediante FISH debido a que las sondas actualmente descritas para el dominio *Eubacteria* demostraron no cubrir el total de bacterias presentes en la muestra.

El porcentaje de materia inerte (bacterias no viables) también se puede calcular de forma directa mediante el marcaje descrito. El porcentaje de bacterias heterótrofas de la muestra de agua ha de calcularse de forma indirecta porque sería necesario diseñar una gran cantidad de sondas específicas para las especies bacterianas pertenecientes a este grupo. De este modo, al porcentaje total (100%) ha de restarse el porcentaje de bacterias autótrofas, el porcentaje de bacterias acumuladoras de poli-fosfatos (PAO) y la materia inerte para resultar el porcentaje de bacterias restante que, con un error mínimo, pertenece a las bacterias heterótrofas.

Otro aspecto de la presente invención es un programa de ordenador

caracterizado porque comprende instrucciones de programa para provocar que un sistema de computación realice un método que comprende:

a. adquirir imágenes de fluorescencia emitida según la reivindicación 6 (b) de, al menos, 20 campos por muestra,
b. determinar las áreas medias de los grupos de bacterias y materia inerte de las imágenes adquiridas en (a) y
c. determinar el balance de DQO y la contribución de cada grupo bacteriano y materia inerte al balance de DQO.

Mediante este programa de ordenador se facilita la adquisición de imágenes de fluorescencia emitida tras irradiar la muestra con una longitud de onda de absorción óptima para el fluoróforo empleado en el marcaje del grupo bacteriano. Este programa permite la adquisición de un número mínimo de 20 campos por cada portaobjetos y por cada canal (imagen resultante de la fluorescencia emitida por cada fluoróforo). La adquisición de las imágenes puede llevarse a cabo de forma aleatoria o con patrones de muestreo establecido. Asimismo también se puede determinar la media de las áreas obtenidas para cada campo y canal. La medida de las áreas está basada en el número de píxeles que forma la superficie de bacterias marcadas. El tratamiento y análisis de las imágenes se lleva a cabo tal como se ha descrito anteriormente, es decir, binarizando las imágenes y obteniendo de forma automática el área. Además, tras la introducción de los parámetros de DQO de la biomasa, DQO total, DQO soluble, DQO suspendida (DQO_{SUSP}), DBO límite total, DBO límite soluble, tiempo de retención de sólidos (SRT) y tiempo de resistencia hidraúlico (HRT), en el programa de ordenador, se determina el balance de DQO y la contribución de cada grupo bacteriano y materia inerte al balance de DQO. Esta determinación se lleva a cabo mediante un cálculo directo por medio de órdenes establecidas en el citado programa de ordenador.

Según una realización preferida del programa de ordenador anterior, la determinación del balance de DQO y la contribución de cada grupo bacteriano y materia inerte al balance de DQO se lleva a cabo mediante la ecuación que comprende:

$$DQO_{SUSP} = X_H + X_A + X_{PAO} + X_I + X_{I0}\frac{SRT}{HRT}$$

Los parámetros de cada una de las ecuaciones han sido descritos anteriormente.

La invención se extiende a programas de ordenador, más particularmente a programas de ordenador en o sobre unos medios portadores, adaptados para poner la invención en práctica. El programa de ordenador puede estar en forma de código fuente, de código objeto o en un código intermedio entre código fuente y código objeto, tal como en forma parcialmente compilada, o en cualquier otra forma adecuada para usar en la implementación de los procesos de acuerdo con la invención El medio portador puede ser cualquier entidad o dispositivo capaz de portar el programa.

En otra realización preferida, el programa de ordenador descrito anteriormente está caracterizado porque se almacena en unos medios de grabación y, en otra realización preferida más, el programa de ordenador es portado por una señal portadora eléctrica.

Por ejemplo, el medio portador puede comprender un medio de almacenamiento, tal como una *ROM*, por ejemplo un *CD ROM* o una *ROM* semiconductora, o un medio de grabación magnético, por ejemplo un *floppy disc* o un disco duro. Además, el medio portador puede ser un medio portador transmisible tal como una señal eléctrica u óptica que puede transmitirse vía cable eléctrico u óptico o mediante radio u otros medios.

Cuando el programa de ordenador está contenido en una señal que puede transmitirse directamente mediante un cable u otro dispositivo o medio, el medio portador puede estar constituido por dicho cable u otro dispositivo o medio.

Alternativamente, el medio portador puede ser un circuito integrado en el que está encapsulado (*embedded*) el programa de ordenador, estando adaptado dicho circuito integrado para realizar los procesos relevantes o para usarse en la realización de dichos procesos.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos,

componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

FIG 1. Muestra la comparación de los métodos de cuantificación por áreas y por número de bacterias para la obtención del porcentaje de bacterias no viables mediante la técnica de Viabilidad Celular. Muestras de la Planta Piloto.

FIG 2. Muestra las imágenes binarizadas de células marcadas con fluoróforo rojo y verde.

FIG 3. Muestra el resultado de una cuantificación de 22 campos.

Las barras representan el porcentaje obtenido en cada campo. La línea azul es una media acumulada para observar si el porcentaje llega a estabilizarse.

FIG 4. Muestra el diagrama de técnicas y resultados de la validación del método.

Figura 5. Resultados experimentales y simulados (fósforo y ácido acético) del modelo ASM2, utilizando los valores de X_{PAO} determinados microbiológicamente para los experimentos 1, 2 y 3.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

A continuación se expone el procedimiento en cada una de las etapas del método propuesto en la presente invención.

1.1. Aplicación de la técnica de la viabilidad celular.

Reactivos:

Se utilizó el kit "L-7012 LIVE/DEAD® *Backlight™ Bacterial Viability Kit for microscopy and quantitative assays*", de *Molecular Probes.*

Solución 1:
- Fluorocromo SYTO 9: 300 µl de solución 3.34 mM en DMSO (Dimetil Sulfóxido)

Solución 2:
- Fluorocromo Ioduro de Propidio: 300 µl de solución 20 mM en DMSO

Se mezclaron bien las soluciones 1 y 2 en un tubo de microcentrífuga, y se conservaron a 4 ºC.

Procedimiento:

1. Se añadieron 0.75 µl de la mezcla de solución 1 + 2 a 250 µl de muestra. Se mezcló bien en el vortex. Esta dilución recomendada supone una concentración de DMSO del 0.3% de la solución de tinción.

2. Se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 10 – 50 minutos manteniendo en agitación.

3. Se tomó un volumen de 5 µl de la muestra teñida y se puso en un portaobjetos tratado con poli-L-lisina para conseguir una adherencia rápida, y se tapó con un cubreobjetos de 18 mm.

4. Se examinó al microscopio de epifluorescencia a 1000x con aceite de inmersión sin fluorescencia. El filtro de excitación para el SYTO 9 es de 480nm, y el de emisión de 500 nm. Para el Yoduro de

propidio, el filtro de excitación es de 490 nm, y el de emisión de 635 nm.

Resultados:

Las células vivas aparecieron de color verde. Las células dañadas aparecieron de color rojo-verde, y las células muertas de color rojo.

1.2. Cálculo del porcentaje de materia inerte (X_I)

El valor de X_I representa el porcentaje de bacterias inertes presentes en la biomasa. El kit para detección de Viabilidad Celular LIVE/DEAD® *BaclightTM de Molecular Probes* permite obtener el porcentaje másico de bacterias viables (vivas) y no viables (no vivas) en una muestra. Este método de viabilidad se basa en la integridad de la membrana celular, de modo que las bacterias con la membrana intacta son clasificadas como viables, y las bacterias con la membrana dañada como no viables. Se asumió que el porcentaje másico de bacterias inertes coincide con el de bacterias no viables.

Para la obtención del porcentaje de materia inerte se midió el porcentaje de área ocupado por las bacterias no viables tal como se describe en el apartado siguiente.

1.3. Detección de grupos bacterianos mediante técnicas FISH.

Reactivos

1- Paraformaldehido (Para llevar a cabo la fijación).

1. Se calentaron 65 ml de agua bidestilada hasta 60ºC.
2. Se añadieron 4 g de paraformaldehido (PFA).
3. Se añadió 1 gota de solución de NaOH 2M y se agitó rápidamente hasta que la solución se clarificó la solución.
4. Se quitó de la fuente de calor y se añadieron 33 ml de PBS 3X.

5. Se ajustó el pH a 7.2 con HCl.
6. Se eliminó cualquier resto de cristales por filtración a través de 0.2 µm.
7. Se enfrió rápidamente a 4ºC y se conservó a esa temperatura.

2- Tampón fosfato salino (XPBS) (Para llevar a cabo la fijación).

1. Se esterilizó por filtración a 0.45 µm ó 0.2 µm.
2. Se conservó a 4ºC.

Para preparar 3X PBS para el reactivo de paraformaldehido se mezclaron:

22.8 g de NaCl
3 g de NaH_2PO_4
2.88 g de Na_2HPO_4
1000 ml Agua destilada
Se ajustó a pH 7.4

3- Solución de gelatina (preparación portaobjetos)

Gelatina al 0.1 %.
Sulfato potásico cromato al 0.01 % (Sigma ref. C-5926, $12H_2O$).

1. Se calentó agua destilada a 60ºC.
2. Se fundió la gelatina (100 mg de gelatina + 10 mg de sal de cromato·$12H_2O$) en 100 ml de agua destilada.
3. Se enfrió a 50ºC para sumergir los portas.

4- Solución de limpieza de portaobjetos FISH: Etanol con 10 % KOH.

5- Etanol 100% (Fijación y lavado): Reactivo etanol absoluto grado PRS. Guardar a temperatura ambiente para lavados, y a 4ºC para fijación.

6.- Etanol 80% (Lavado): 160 ml de etanol absoluto y 40 ml de agua destilada.

7- Etanol 50% (Lavado): 100 ml de etanol absoluto y 100 ml de agua destilada.

8- Cloruro Sódico 5M (Tampón de hibridación y tampón de lavado): 292.2 g de cloruro sódico y 1000 ml de agua destilada.

1. Se disolvió el NaCl en 800 ml de agua destilada y se ajustó el volumen hasta un litro.
2. Se esterilizó en autoclave a 121ºC durante 15 minutos y por filtración.

9- EDTA 0.5M (cuando la concentración de formamida es ≥ al 20%): Se esterilizó en autoclave a 121ºC durante 15 minutos y por filtración.

10- Tris-HCl 1M pH 8.0 (Tampón de hibridación y tampón de lavado): 121.1 g de tris base, 42 ml de HCl concentrado y se llevó hasta 1 litro con agua destilada.

Se pesó el TRIS y se añadió a 800 ml de agua destilada. S añadió el HCl concentrado y se completó con agua destilada hasta 1 litro. Se esterilizó en autoclave a 121ºC durante 15 minutos y por filtración.

11- Agua Mili-Q (Tampón de hibridación y tampón de lavado): 200 ml de agua Mili-Q. Se esterilizó en autoclave a 121ºC durante 15 minutos y por filtración.

12- SDS 10% (Tampón de hibridación y tampón de lavado): 10 g de SDS. Se llevó hasta 100 ml con agua destilada. Se esterilizó en autoclave a 121ºC durante 15 minutos y por filtración.

13- Formamida (Tampón de hibridación y tampón de lavado): Volúmenes de formamida y porcentaje en función de la sonda. Se guardaron a temperatura ambiente.

14- Tampón de hibridación:

Tabla 1. Volúmenes de reactivos en función del porcentaje de formamida para la preparación del tampón de hibridación en la técnica FISH.

Reactivo	% de Formamida						
	10	20	25	30	35	40	45
NaCl 5M (µl)	360	360	360	360	360	360	360
HCl-Tris 1M (µl)	40	40	40	40	40	40	40
Formamida (µl)	200	400	500	600	700	800	900
Agua Mili-Q (µl)	1398	1198	1098	998	898	798	698
SDS 10% (µl)	2	2	2	2	2	2	2
Volumen Final (µl)	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000

15- Tampón de lavado: Se precalentó a 46 ºC en un tubo de 50 ml.

Tabla 2. Volúmenes de reactivos en función del porcentaje de formamida para la preparación del tampón de lavado en la técnica FISH.

Reactivo	% de Formamida						
	10	20	25	30	35	40	45
NaCl 5M (µl)	4500	2150	1490	1020	700	460	300
EDTA 0.5M (µl)	500	500	500	500	500	500	500
HCl-Tris 1M (µl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Agua Mili-Q (ml)	44.45	46.3	46.96	47.43	47.75	47.99	48.15
SDS 10% (µl)	50	50	50	50	50	50	50
Volumen Final (ml)	50	50	50	50	50	50	50

17- Citifluor: Reactivo para evitar pérdida de fluorescencia.

Procedimiento

Tratamiento de los portaobjetos FISH cubiertos con Teflón

Se compraron portaobjetos con una lámina de teflón en la que están perforados 10 pocillos de 8 mm de diámetro.

1. Se lavaron con solución de limpieza.
2. Se enjuagaron con agua destilada.
3. Se secaron al aire (proteger del polvo ambiental).

4. Se cubrieron con gelatina por inmersión en la solución de gelatina 0.1% con sulfato potásico cromato 0.01% (preparada en el momento, T = 60ºC).
5. Se secaron al aire.

Fijación de las bacterias GRAM negativas de las muestras

1. Se lavó 1 ml de flóculo con 500 µl de PBS 1X (6000 rpm durante 3 minutos).
2. Se añadieron 3 volúmenes de paraformaldehido (PFA) (750 µl) a 1 volumen (250 µl) de muestra y mantener a 4ºC durante 1-3 h (mínimo 1 h y máximo 18 h).
3. Se centrifugaron las muestras para recoger las células (6000 rpm durante 3 minutos) y eliminar el fijador.
4. Se lavaron las células con PBS 1X (500 µl).
5. Se resuspendieron en PBS 1X (500 µl) (para tener una concentración de 10^8 – 10^9 células/ml) y se añadió 1 volumen (500 µl) de etanol absoluto frío (4ºC).
6. Se guardaron a -20ºC (las muestras se pueden conservar en estas condiciones durante varios meses).

Fijación de las bacterias GRAM negativas de las muestras

1. Se añadió 1 volumen de etanol absoluto (500 µl) a 1 volumen (500 µl) de muestra y mantener a 4ºC durante 4 – 16 h.
2. Se centrifugaron las muestras para recoger las células (6000 rpm durante 3 minutos) y eliminar el fijador.
3. Se lavaron las células con PBS 1X (500 µl).
4. Se resuspendieron en PBS 1X (500 µl) (para tener una concentración de 10^8 – 10^9 células/ml) y se añadió 1 volumen (500 µl) de etanol absoluto frío (4ºC) y mezclar.
5. Se guardaron a -20ºC (las muestras se pueden conservar en estas condiciones durante varios meses).

Aplicación de las muestras a los portaobjetos FISH

1. Se puso un volumen de 3 µl de muestra fijada en el portaobjetos.

2. Se secó al aire.
3. Se deshidrató en EtOH al 50% durante 3 minutos (por inmersión).
4. Se deshidrató en EtOH al 80% durante 3 minutos (por inmersión).
5. Se deshidrató en EtOH absoluto durante 3 minutos (por inmersión).
6. Tras la deshidratación, los portaobjetos pueden ser conservados indefinidamente.

Hibridación "in situ"

1. Se prepararó la solución de hibridación con formamida Tabla en un eppendorf de 2 ml.
2. De la solución de hibridación con formamida, se reservó en un eppendorf 6 x (10-n) µl, siendo n el volumen de sonda utilizada en cada pocillo. Es decir:

Nº de pocillos en un porta: 6

Volumen total por pocillo (µl): 10

Si n = 1 µl se guardarán 54 µl. Si n = 2 µl se guardarán 48 µl. Si n = 3 µl se guardarán 42 µl

3. Se añadió al eppendorf reservado 6 µl de sonda (6 pocillos por porta → 6 µl de sonda)
4. Se puso un trozo de papel de celulosa dentro de un tubo Sarstedt de 50 ml y se echó sobre el papel la solución de hibridación sin sonda.
5. Se pusieron 9 µl de la solución de hibridación + 1 µl de sonda en cada pocillo y se repartió homogéneamente por todo el campo.
6. Se introdujo el portaobjetos dentro del tubo Sarstedt, manteniendo siempre la posición horizontal.
7. Se incubó a 46 ºC durante una hora y media.
8. Se prepararon 50 ml de la solución de lavado, y se atemperó a 48 ºC.
9. Se sacó del horno y rápidamente se lavaron e introdujo dentro del tubo con la solución de lavado.
10. Se incubó en un baño a 48 ºC durante 15 – 20 minutos.
11. Se lavó con agua destilada.
12. Se secó al aire en la oscuridad.

13. Se observó al microscopio.

1.4. Detección de grupos bacterianos mediante tinción con DAPI (diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol).

Reactivos

Reactivo DAPI (Kawaharasaki *et al.* (1999). Water Res. 33: 257–256).
5 mg de DAPI sobre 100 ml de PBS (1x, pH = 7.2).
Concentración de trabajo: 50 µg/ml (solución de trabajo).
Se almacenó la solución de stock a -20ºC, y la de trabajo a 4ºC.
Se esterilizó por filtración.

Tampón Citrato para DAPI:
Reactivo a mezclar con fluoroguard cuando se utiliza DAPI para evitar interferencias del fluoroguard con el fluorocromo.

Procedimiento

1. Tras hibridar, se añadieron 50 µl de solución DAPI de trabajo por pocillo.
2. Se dejó durante 5 minutos en la oscuridad, y a temperatura ambiente.
3. Se lavó con agua destilada.
4. Se dejó secar al aire.
5. Se observó en el microscopio de epifluorescencia.

1.5. Obtención del porcentaje de bacterias.

El porcentaje de bacterias totales de una muestra determinada está compuesto por distintos grupos bacterianos. En la siguiente ecuación se muestran cada uno de los grupos, cuya suma se iguala al total de bacterias de la muestra, considerándose éste el 100%.

$$X_T = X_I + X_A + X_{PAO} + X_H$$

La determinación del porcentaje de bacterias no viables o materia inerte (X_i) se ha explicado en el apartado 1.2.

Obtención del porcentaje de bacterias autótrofas (X_A).

Se obtuvo el porcentaje másico de bacterias autótrofas presentes en la biomasa. Para ello, se combinó la técnica FISH y la tinción con DAPI.

Mediante la técnica FISH, se obtuvo el porcentaje de área ocupado por bacterias autótrofas frente al área ocupada por las bacterias del dominio *Eubacteria*. Con la tinción con DAPI se corrigió el porcentaje obtenido mediante FISH debido a que las sondas actualmente descritas para el dominio *Eubacteria* demostraron no cubrir el total de bacterias presentes en la muestra. El porcentaje de bacterias hibridadas con la sonda EUBmix (sondas de la tabla 4 utilizadas conjuntamente) frente a bacterias teñidas con DAPI ha resultado ser 90 ± 3 % para la Planta Piloto, y de 91 ± 1% para el *Sequencing Batch Reactors* (SBR). Debido a la poca variabilidad que presentan estos resultados, se aconseja la utilización de dicho rango de valores como valores típicos para la calibración del modelo mediante el método aquí expuesto.

Tabla 3. Sondas FISH asociadas a bacterias autótrofas:

Sonda	Secuencia (5'- 3')	Bacteria diana	% FA	Referencia
Nso1225	SEQ ID NO: 1	Betaproteobacteria oxidante de amonio	35	Mobarry *et al.*, (1996). Appl Environ Microbiol. 62: 2156-2162.
NIT3+	SEQ ID NO: 2	Nitrobacter spp.	40	Mobarry *et al.*, (1996). Appl Environ Microbiol. 62: 2156-2162.

+ Necesita sonda competidora

Tabla 4. Sondas FISH asociadas al dominio eubacteria (sondas EUBmix):

Sonda	Secuencia (5'- 3')	Bacteria diana	% FA	Referencia
EUB338	SEQ ID NO: 3	Consenso *Eubacteria*	0-50	Amman *et al.*, (1990). Appl. Environ. Microbiol. **56**, 1919–1925 (1990).

EUB338 II	SEQ ID NO: 4	*Planctomycetales*	0-50	Daims *et al.*, (1999). Syst. Appl. Microbiol. **22**: 434-444.
EUB338 III	SEQ ID NO: 5	*Verrucomicrobiales*	0-50	Daims *et al.*, (1999). Syst. Appl. Microbiol. **22**: 434-444.

El modelo ASM2 supone que el contenido en bacterias autótrofas es debido únicamente a la presencia de bacterias nitrificantes *Nitrosomonas* o *Nitrobacter*. Sin embargo, en los sistemas biológicos de tratamiento de aguas residuales podrían cobrar importancia algunas otras especies autótrofas. Entre ellas cabe destacar:

- Bacterias que extraen su energía de procesos de oxidación de sales ferrosas o manganosas, pertenecientes a los géneros *Clonothrix, Leptothrix*, etc.

- Tiobacterias, como *Thiotrix, Beggiatoas*, capaces de oxidar el SH_2 y el azufre a ácido sulfúrico.

- Bacterias oxidadoras de hidrógeno como las *Hydrogenomonas*, que oxidan el hidrógeno producido por las bacterias heterótrofas en las fermentaciones de los glúcidos, produciendo agua.

En general, en sistemas de tratamiento de aguas residuales convencionales, la cantidad de dichas bacterias suele ser despreciable, con lo que no se comete un error importante asumiendo que las *Nitrosomonas* y las *Nitrobacter* son las únicas bacterias autótrofas del sistema.

La cuantificación de las especies se realizó siguiendo el procedimiento explicado en el ejemplo 1.6.

El valor de X_A en unidades de DQO por litro se obtuvo mediante el porcentaje másico de bacterias autótrofas frente a bacterias del dominio *Eubacteria*, corregido mediante la relación EUB/DAPI, y multiplicado por el valor de DQO. El procedimiento consistió en obtener el porcentaje de bacterias autótrofas frente a bacterias totales (representadas por el dominio

eubacteria): %A. Para ello se obtiene el porcentaje de bacterias hibridadas con la sonda EUBmix frente al total de bacterias presentes en la muestra (obtenidas por la tinción con DAPI): %EUB/DAPI. A continuación se multiplica %A x (%EUB/DAPI)/100, obteniéndose el porcentaje de bacterias autótrofas frente al total de bacterias marcadas por DAPI: %A'.

De acuerdo con la ecuación del balance de DQO:

$$X_H + X_A + X_{PAO} + X_I + X_{I0}\frac{SRT}{HRT} = DQO_{SUSP}$$

el lado derecho de la igualdad es conocido, ya que la DQO se habrá determinado analíticamente, la X_{I0} la obtendremos según los parámetros del agua afluente, y el HRT y el SRT son variables de operación conocidas. Suponiendo que este valor (lado derecho de la ecuación) fuera 100 mg DQO/l, la DQO debida a las bacterias autótrofas se podría calcular como 100 x (%A'). El valor de %A' debe utilizarse en porcentaje sobre 1. Es decir, si %A'= 80, la DQO debida a estas bacterias será 100 x 0,8 = 80 mg DQO/l.

Obtención del porcentaje de bacterias PAO (X_{PAO}).

En este caso, se procede del mismo modo que en el caso de la determinación de X_A. Sin embargo, para la determinación de bacterias con fenotipo PAO mediante la técnica FISH, la variedad bacteriana está mucho más definida. Además de la combinación de sondas EUBmix, para la cuantificación de las bacterias con fenotipo PAO habrá que aplicar las sondas que se describen en la tabla 5.

El valor de X_{PAO} se obtendrá como el resultado de corregir mediante la relación EUB/DAPI el valor del porcentaje PAOmix/EUB, y multiplicar el resultado por el valor del balance de la DQO, al igual que en caso del cálculo de X_{PAO}.

Tabla 5. Sondas FISH asociadas a bacterias con fenotipo PAO (sondas PAOmix).

Sonda	Secuencia (5'- 3')	Bacteria diana	% FA	Referencia
PAO 462	SEQ ID NO: 6	Subgrupo *Rhizophagus tenuis*	35	Crocetti *et al.*,(2000). *Appl Environ Microbiol.*, 66, 1175-

				1182.
PAO 651	SEQ ID NO: 7	*Accumulibacter phosphatis*	35	Crocetti *et al.*,(2000). *Appl Environ Microbiol.*, 66, 1175-1182.
PAO 846	SEQ ID NO: 8	Subgrupo R. tenuis	35	Crocetti *et al.*,(2000). *Appl Environ Microbiol.*, 66, 1175-1182.

Las sondas pueden ser diseñadas en el propio laboratorio, o adquiridas a través de centros que se dedican ello, y en los que se pueden adquirir las sondas marcadas con un fluorocromo específico, o incluso sin marcar. En el caso de este estudio, se ha optado por adquirir las sondas ya marcadas, de forma que se reduce la posible fuente de errores.

Las sondas se han adquirido a través de TIB MOLBIOL (Alemania). Existen bases de datos para consultar secuencias y especificidad de las sondas a través de Internet en páginas como:

http://www.tib-molbiol.com: Empresa dedicada al diseño y distribución de sondas.
http://www.microbial-ecology.net: Base de datos online de sondas marcadas para ARN ribosómico
http://www.ncbi.nlm.nih.gov: Centro Nacional de Información Biotecnológica.
http://www.wga.bv.tum.de: Aquí podemos acceder al fichero en pdf/word del cuestionario sobre biografía de una muestra para la técnica FISH. Institute of Water Quality Control and Waste Managment, Universidad Técnica de Munich.

Obtención del porcentaje de bacterias heterótrofas (X_H).

Debido a la gran diversidad de bacterias heterótrofas presentes en la biomasa de un proceso de fangos activos, sería inviable la aplicación de sondas para la obtención del porcentaje de bacterias heterótrofas. Sin embargo, volviendo a la ecuación en la que se iguala el porcentaje de bacterias totales a la suma de bacterias no viables, autótrofas, PAO y heterótrofas, podemos observar que la X_H es el único parámetro que queda

por determinar en esta ecuación. Así, el valor de X_H puede obtenerse despejándolo de dicha ecuación, quedando así resueltas todas las incógnitas del sistema mediante un cálculo directo.

$$X_H = 100\ \% - (X_A + X_{PAO} + X_I)$$

1.6. Cálculo del área ocupada por bacterias.

El método desarrollado para la cuantificación de las distintas especies microbianas presentes en las muestras se dividió en cinco etapas básicas:

1. Toma de muestra. Las muestras se tomaron de una parte representativa del fango o cultivo de bacterias. Para ello, fue necesario que el reactor estuviese completamente mezclado.

2. Aplicación de la técnica de hibridación *in situ*, FISH.
- Fijación. Se paraliza toda actividad bacteriana presente en una muestra con un contenido en bacterias de aproximadamente $10^8 - 10^9$ bacterias por mililitro.
- Hibridación con las sondas pertinentes según el protocolo descrito en el ejemplo 1.5.
- En este punto, el cálculo del área también se puede llevar a cabo mediante experimentos de viabilidad celular. Las células viables se marcan con un fluoróforo y las no viables con otro fluoróforo diferente. En la FIG 1 podemos observar la comparación de los métodos de cuantificación por áreas y por número de bacterias para la obtención del porcentaje de bacterias no viables mediante la técnica de Viabilidad Celular.

3. Observación en el microscopio y toma de imágenes. Una vez realizada la hibridación, los portaobjetos se examinaron bajo un microscopio de epifluorescencia o un microscopio confocal láser, con los filtros adecuados según los fluorocromos utilizados. Mediante una cámara digital acoplada al microscopio se tomaron imágenes de entre 20 y 40 campos representativos de la muestra hibridada. Se utilizó la cámara digital DP-12 de Olympus acoplada a un microscopio modelo BX-50 también de Olympus. Las imágenes fueron captadas en color, aunque en función del tipo de análisis

a realizar, también podrían ser captadas en escala de grises. Las imágenes tomadas corresponden a muestras hibridadas según la metodología de la técnica FISH, de modo que se trata de imágenes de fluorescencia en las que en general la intensidad no es muy alta. Es importante tomar las imágenes con un tiempo de exposición elevado de manera que la intensidad de las mismas sea lo más alta posible, sin llegar a saturar las áreas de interés de la imagen, lo que provocaría la pérdida de la información de intensidad de la señal. De este modo llegamos a obtener una imagen con la máxima información posible.

4. Cuantificación de los datos mediante software.

El procesado de la imagen se lleva a cabo en varios pasos:

a. Adquisición de las imágenes en el programa de procesado y análisis de imágenes. En la presente invención se utilizó un programa de cálculo matemático como el MATLAB© para el procesado de las imágenes. Este software permitió el tratamiento de las imágenes basándose no sólo en la apariencia de las imágenes, sino en la información numérica que en ella se contiene, la información de cada píxel individual.

Una vez la imagen fue adquirida, los inventores se centraron en el tratamiento independiente de los diferentes canales (rojo, verde o azul). Cada color corresponde a un grupo bacteriano, autótrofas y PAO, así como viables y no viables.

b. El siguiente paso fue la binarización y selección del valor umbral. Para poder cuantificar un área en una imagen, fue necesario que existiera una diferenciación clara entre los grupos de píxeles que conforman la imagen. Por ello, se convirtió la imagen en blanco y negro, de forma que la señal positiva estuviera representada por los píxeles blancos, y la negativa o "background" por los píxeles negros. Binarizar una imagen consiste en pasarla a blanco y negro (no a escala de grises) de forma que la información contenida en los píxeles conste únicamente de ceros y unos. Los píxeles negros se representarán por un "0", mientras que a los píxeles blancos se les asignará un "1". De esta forma el software de cuantificación es capaz de cuantificar los píxeles correspondientes a cada una de las clases, "blanco" o "negro" y por tanto, sus áreas correspondientes (FIG 2).

El software de cuantificación devolvió un informe detallado de los porcentajes de áreas ocupadas por las bacterias presentes en la muestra hibridada.

Este proceso se repitió para cada uno de los campos fotografiados, al menos 20. Con todos los resultados obtenidos se construyó una gráfica, en la que se representó el porcentaje obtenido en cada imagen, y una media acumulada de todos los campos (FIG 3).

5. Análisis de los resultados. El informe debe ser revisado cuidadosamente con el fin de filtrar posibles resultados erróneos o estadísticamente incoherentes.

El resultado final es un número que representa el porcentaje en área de una especie bacteriana en la muestra. El software de cuantificación permite obtener un resultado preciso, fiable y rápido sin la necesidad de la intervención de un operador experto. La siguiente tabla muestra el número de píxeles obtenido en cada uno de los canales rojo y verde y el cálculo del porcentaje de bacterias PAO.

Tabla 6. Resultados de los recuentos bacterianos realizados mediante el software de cuantificación.

Foto canal Rojo	**Foto canal Verde**	**Píxeles canal Rojo**	**Píxeles canal Verde**	**%PAO**
1	2	731127	943899	77
3	4	312980	365174	86
5	6	2772661	3041602	91
7	8	2363910	2500077	95
9	10	2359703	2691321	88
11	12	2385525	2537820	94
13	14	2284635	2355486	97
15	16	2637185	2782086	95
17	18	1758334	2029187	87
19	20	2584021	2740971	94

Una de las ventajas importantes del método de cuantificación desarrollado es que puede ser aplicado perfectamente utilizando un microscopio de fluorescencia convencional, lo que supone un importante ahorro económico y de recursos.

1.7. Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO)

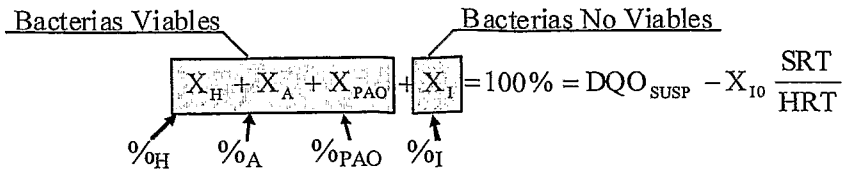
Para la determinación de la (DQO) se utilizaron dos métodos analíticos dependiendo de la concentración esperada en la muestra:

- 50 < DQO esperada < 900 (mg DQO/l): Se utilizó el método estándar de oxidación de la materia orgánica con dicromato mediante digestión con reflujo abierto (APHA, (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21st edition. American Public Health Association, Washington, DC). Este test se llevó a cabo por calentamiento bajo condiciones de reflujo total de un determinado volumen de muestra de agua con un exceso conocido de dicromato, en presencia de ácido sulfúrico del 96%. El periodo de reflujo estándar fue de dos horas. El exceso de dicromato se determina mediante una valoración redox.

- 10 < DQO esperada < 150 (mg DQO/l): Se utilizó el test de la firma comercial Merck (Spectroquant®). Consistió en una digestión con reflujo cerrado y determinación colorimétrica del exceso de dicromato.

1.8. Obtención de los valores absolutos de DQO de cada grupo bacteriano.

La contribución de cada uno de los grupos bacterianos a la determinación de la DQO se lleva a cabo aplicando la siguiente ecuación;



En el siguiente apartado de validación del método se describe más concretamente cómo se lleva a cabo el cálculo y la asignación de cada uno de los parámetros.

EJEMPLO 2. Validación del método

El método propuesto ha sido validado para el caso particular de un sistema SBR enriquecido en bacterias con fenotipo PAO (Organismos Acumuladores de Poli-fosfato) para eliminación biológica de fósforo. En este tipo de sistemas se obtienen poblaciones de bacterias con fenotipo PAO con abundancias cercanas al cien por cien. Para ello, se han comparado los valores de los parámetros obtenidos mediante una calibración convencional, con los obtenidos mediante el método propuesto en esta invención, utilizando los datos de tres calibraciones llevadas a cabo por el Doctor Ramón Barat en su tesis "Estudio de la precipitación de fósforo inducida biológicamente en el tratamiento de aguas residuales", presentada en el año 2004 en la Universidad Politécnica de Valencia (Barat, R. (2004). Estudio de la precipitación de fósforo inducida biológicamente en el tratamiento de aguas residuales. Universidad Politécnica de Valencia, Dpto. Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente. Valencia).

2.1. Descripción del proceso

Se utilizó un sistema enriquecido en bacterias con fenotipo PAO para la eliminación biológica de fósforo. El reactor fue operando durante un periodo de ocho meses bajo las condiciones mostradas en la tabla 7. Las muestras analizadas pertenecen a los tres estados estacionarios iniciales distintos descritos en la tabla 8.

Tabla 7. Condiciones de operación de los tres experimentos (Barat, R. (2004) *Estudio de la precipitación de fósforo inducida biológicamente en el tratamiento de aguas residuales.* Universidad Politécnica de Valencia, Depto. Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente. Valencia).

Experimento	TRC (días)	$P_{alimento}$ (mg/l)	$HAc_{alimento}$ (mg DQO/l)	$P/DQO_{alimento}$ (gP/ gDQO)	$Ca_{alimento}$ (mg/l)
1	9	10	218	0.046	10
2	10	15	268	0.056	90
3	10	15	268	0.056	60

Tabla 8. Condiciones iniciales para cada uno de los experimentos (Barat 2004).

Experimento	1	2	3
Sólidos suspendidos (mg/l)	1050	2438	1588
% sólidos suspendidos volátiles	72.0	62.5	65.1
DQO total (mg/l)	1200	2300	1300
P total (mg P/l)	111	308	180
P precipitado (mg P/l)	n.d.	20.9	20.3
P soluble (mg P/l)	4.2	7.3	11.9
Calcio (mg Ca/l)	10	90	60
Ácido acético (mg DQO/l)	112.0	138.7	138.7
pH	7.33	7.50	7.60

2.2. Medida de la DQO del fango

La DQO total del fango, DQO_T, fue medida al final de la etapa aerobia de cada uno de estos experimentos. Teniendo en cuenta que todo el acetato (VFA) suministrado al inicio de cada experimento fue totalmente consumido durante la etapa anaerobia, se puede asumir que la DQO total del fango al final de la etapa aerobia correspondió únicamente a la DQO de la biomasa, o DQO suspendida (DQO_{SUSP}). En la tabla 9 se muestran los valores de DQO obtenidos en cada uno de los experimentos.

Tabla 9. DQO del fango al final de la etapa aerobia (Barat 2004).

Experimento	1	2	3
DQO_{TOTAL} (mg/l)	1200	2300	1300

Por otra parte, es importante remarcar que debido a que el reactor de laboratorio utiliza un agua residual sintética, y ésta no contiene sólidos

suspendidos, el parámetro X_{I0} es cero. De este modo, la ecuación para determinar la DQO total quedaría escrita para este caso concreto del siguiente modo:

$$DQO_{TOTAL} = X_H + X_A + X_{PAO} + X_I$$

Consideraciones sobre el balance de DQO

En un sistema biológico convencional de tratamiento de aguas residuales, la DQO_{SUSP} puede asimilarse a la contribución de los distintos tipos de bacterias presentes, X_S, y a la fracción inerte de las mismas, X_I.

Sin embargo, en el caso concreto de estudio, con una muestra enriquecida en bacterias con fenotipo PAO, se asumió que la contribución de bacterias heterótrofas y autótrofas a la DQO total del fango es despreciable. Así pues, la ecuación quedaría como sigue;

$$DQO_{SUSP} = X_{PAO} + X_I$$

Por otra parte, en un sistema de estas características, se podría esperar la presencia de bacterias con fenotipo GAO (bacterias acumuladoras de glicógeno), así que habría que tener en cuenta la contribución de estas al valor de la DQO del fango. La ecuación quedaría de la siguiente forma;

$$DQO_{SUSP} = X_{PAO} + X_{GAO} + X_I$$

En este caso concreto, para poder calibrar los parámetros del modelo ASM2 se resolvieron los parámetros de la ecuación anterior. Como el valor de la DQO del fango era conocida, tan solo fue necesario determinar mediante los métodos microbiológicos propuestos, los porcentajes de bacterias con fenotipos PAO y GAO, y bacterias inertes.

En la FIG 4 se muestra resumidamente el flujo de trabajo para realizar una determinación de éste tipo.

2.3. Obtención microbiológica de los porcentajes de PAO, GAO y bacterias inertes.

Siguiendo el procedimiento experimental descrito en el ejemplo 1 de la presente invención, se ha obtenido la distribución de las poblaciones microbianas para cada uno de los experimentos (tabla 11). Para el porcentaje de bacterias hibridadas con las sondas EUBmix (combinación de las sondas EUB338 I, II y III, que hibrida sobre el dominio *Eubacteria*), frente al número total de bacterias teñidas con DAPI, se ha utilizado el valor obtenido de los experimentos descritos en la obtención del porcentaje de bacterias autótrofas (X_A) del ejemplo 1.5, es decir, %EUB/DAPI = 91 ± 1 %. Esta relación permitió corregir los porcentajes obtenidos mediante la técnica FISH.

Las poblaciones bacterianas estudiadas mediante FISH fueron las poblaciones relevantes en los procesos de *Enhanced biological phosphorus renoval* (EBPR), es decir, poblaciones con fenotipos PAO y GAO. Para las poblaciones bacterianas con fenotipo PAO se utilizó la combinación de sondas PAO descritas en la determinación de bacterias PAO (X_{PAO}) del ejemplo 1.5.

Para la detección de las poblaciones de bacterias con fenotipo GAO, se utilizaron las sondas de la tabla 10.

Tabla 10. Sondas FISH asociadas a bacterias con fenotipo GAO.

Sonda	Secuencia (5'- 3')	Bacteria diana	% FA	Referencia
GAOQ431	SEQ ID NO: 9	Algunas *Competibacter*	35	Crocetti *et al.* (2002). *Microbiology.* 148: 3353-3364
GAOQ989	SEQ ID NO: 10	Algunas *Competibacter*	35	Crocetti *et al.* (2002). *Microbiology.* 148: 3353-3364
TFO_DF218	SEQ ID NO: 11	Organismos relativos a *Defluviicoccus*	25-35	Wong *et al.* (2004). *Microbiology.* 150: 3741-3748
TFO_DF618	SEQ ID NO: 12	Organismos relativos a *Defluviicoccus*	25-35	Wong *et al.* (2004). *Microbiology.* 150: 3741-3748

DEF988+	SEQ ID NO: 13	Organismos relativos a *Defluviicoccus*	35	Meyer *et al.* (2006). *Microbiology.* 152: 419-429
DEF1020+	SEQ ID NO: 14	Organismos relativos a *Defluviicoccus*	35	Meyer *et al.* (2006). *Microbiology.* 152: 419-429

+ Necesita sonda competidora

Para la cuantificación de las poblaciones bacterianas hibridadas mediante la técnica FISH se utilizó el software de cuantificación descrito en el ejemplo 1.6 de la presente invención.

Para la obtención de los valores de Viabilidad Celular, la técnica fue aplicada según lo descrito en el ejemplo 1.1. Los valores de los porcentajes másicos de bacterias con fenotipos PAO y GAO, y los resultados de la aplicación de la técnica de Viabilidad Celular para los tres experimentos, quedan reflejados en la tabla 11.

Tabla 11. Distribución de las poblaciones microbianas, en porcentajes másicos, relativas a procesos de EBPR para los tres experimentos realizados.

Experimento	1	2	3
% PAO/EUB	89 ± 8	90 ± 7	90 ± 6
% GAO/EUB	0	< 1	< 1
% DEF/EUB	5 ± 2	< 1	4 ± 2
% PAO/DAPI	81 ± 7	82 ± 6	82 ± 5
% GAO/DAPI	0	< 1	< 1
% DEF/DAPI	5 ± 2	< 1	4 ± 2
Total cels/ml 10^{-8}	3.20	3.29	3.05
% Viables	84	90	88
% No viables	16	10	12

En la tabla 11 se puede apreciar que las bacterias con fenotipo GAO estuvieron prácticamente ausentes durante todo el periodo de operación del SBR. Tan sólo se llegó a observar una ligera presencia de bacterias

con fenotipo GAO que no llegó a superar el 5% en masa de la población bacteriana total en ninguno de los casos. Por esta razón, se ha decidido despreciar la contribución de las bacterias GAO a la DQO del fango para posteriores cálculos.

2.4. Cálculo de los valores de X_{PAO} y X_I

Como se muestra en la tabla 11, el porcentaje de bacterias con fenotipo PAO en todos los experimentos fue muy elevado, por tanto se puede afirmar que se trata de un cultivo altamente enriquecido en bacterias PAO. De esta forma, se confirma que no se cometió un error importante al suponer que la contribución de las bacterias heterótrofas y autótrofas a la DQO total del fango era despreciable.

Asumiendo que el área total ocupada por las bacterias representa la fracción (X_{PAO} + X_{GAO}), conocido el porcentaje de bacterias PAO en la muestra, y teniendo en cuenta que la cantidad de bacterias GAO fue prácticamente despreciable en los tres experimentos (siempre menor al 5 %), es posible calcular la X_{PAO} multiplicando la DQO_{SUSP} por el porcentaje de PAO en cada experimento. Los resultados se muestran en la tabla 12.

Por otra parte, ya que se despreció la presencia de bacterias GAO, la fracción $X_{GAO,\ I}$ (fracción de bacterias GAO no viables), también fue despreciable. Así pues la fracción $X_{PAO,\ I}$ se asoció a bacterias PAO dañadas o muertas, es decir, bacterias no viables. Por tanto, fue posible calcular el parámetro ($X_{PAO,\ I}$) aplicando el porcentaje de bacterias no viables sobre la DQO_{SUSP}, que en este caso se correspondía con la DQO_{TOTAL}. Esto será cierto siempre que se trate de un sistema como el estudiado, en el que la fracción de X_{I0} de entrada es nula, ya que el alimento proporcionado al sistema es un alimento totalmente soluble.

La determinación directa del valor de X_I (en este caso $X_{PAO,\ I}$), supone una importante disminución en la incertidumbre del proceso de cálculo a la hora de calibrar los parámetros del modelo ASM2.

Tabla 12. Fracciones de la DQO obtenidas en cada experimento.

Experimento	1	2	3
DQO_{TOTAL} (mg/l)	1200	2300	1300
% PAO/DAPI	81	82	82
X_{PAO} (mg/l)	972	1884	1065
% No viables	16	10	12
$X_{PAO,I}$ (mg/l)	192	230	156

La determinación de los valores de X_{PAO} y $X_{PAO,\ I}$ está sujeta a algunas simplificaciones:

- Se despreció la cantidad de bacterias con fenotipo GAO presentes en la biomasa.
- Se asumió que en un sistema de EBPR enriquecido como éste, la cantidad de bacterias heterótrofas y autótrofas presentes en la biomasa es despreciable, $X_H = 0$ y $X_A = 0$.
- Se supuso que, debido a la homogeneidad de la población bacteriana, era posible relacionar de forma directa el valor de la DQO y el porcentaje de área que ocupan las bacterias PAO. En un sistema heterogéneo, con bacterias de diferentes tamaños (PAO, GAO, filamentosa, etc.), los porcentajes de área deberían normalizarse para poder ser aplicados sobre el valor de la DQO.
- Se despreció la presencia de fracciones inertes en el fango o el agua de entrada a la planta, que podrían aportar una fracción de DQO al parámetro X_I

Es importante remarcar que este valor se obtiene directamente del examen de la biomasa, y no como resultado de técnicas de calibración convencionales que no aseguran un resultado debido exclusivamente al tipo de bacterias a calibrar. De modo que se podría decir que el resultado obtenido mediante la combinación de técnicas microbiológicas proporciona un valor "real" del contenido en bacterias (de un grupo específico) en la biomasa del fango activo.

2.5. Comparación de los valores de X_{PAO} determinados mediante calibración y mediante el método microbiológico propuesto.

Con el fin de validar el método propuesto de determinación del valor de X_{PAO}, se compararon los valores obtenidos mediante una calibración convencional (ajuste matemático para la minimización de errores), y los obtenidos con ayuda de las técnicas microbiológicas moleculares mediante el método propuesto. En la tabla 13 se muestran los valores obtenidos mediante el método de calibración tradicional (*calib.*) y el método de calibración microbiológico propuesto (*micro.*)

Tabla 13. Valores de X_{PAO} obtenidos por calibración y microbiológicamente.

Experimento	1	2	3
DQO_{TOTAL} (mg/l)	1200	2300	1300
X_{PAO} (mg/l) calib.	1016	1916	1083
% X_{PAO} / DQO_T calib.	85	83	83
X_{PAO} (mg/l) micro.	972	1884	1065
% X_{PAO}/DQO_T micro.	81	82	82

Como se puede observar en la tabla 13, los valores de X_{PAO} obtenidos mediante el método microbiológico coinciden casi a la perfección con los valores utilizados en la calibración del modelo por Barat, (2004). En el peor de los casos, la desviación entre el valor obtenido mediante la calibración y el obtenido microbiológicamente, es del 4 %. Por ello, es posible concluir que el método propuesto para la obtención de X_{PAO} es válido, y permitiría llevar a cabo la calibración del modelo ASM2 para un SBR con un proceso de EBPR, sin necesidad de realizar un ajuste matemático para la minimización de errores para su obtención. Esto supone una importante disminución en el esfuerzo y el tiempo de cálculo, así como en la fiabilidad del resultado, ya que se trata de una medición directa de los parámetros.

En la FIG 5 se comparan los resultados de las simulaciones utilizando los valores de X_{PAO} obtenidos microbiológicamente, de la evolución en la concentración de fósforo soluble y de ácido acético, con los resultados experimentales.

Tal y como se puede observar en la FIG 5, el modelo es capaz de reproducir con gran exactitud la evolución de la concentración de fósforo y ácido acético en todos los experimentos, con lo que se valida el método de

obtención de X_{PAO} mediante técnicas microbiológicas moleculares. En esta figura, tanto círculos como cuadrados representan los puntos obtenidos experimentalmente, es decir, por medio de analíticas realizadas a muestras de agua extraídas del reactor durante el experimento. Por el contrario, las líneas representan la simulación realizada tras la calibración del modelo para esos casos concretos. Por tanto, las líneas (valores calculados mediante el modelo calibrado) describen perfectamente el comportamiento que muestran los puntos (valores obtenidos experimentalmente mediante analíticas directas). Es decir, que el modelo, calibrado mediante la ayuda del método microbiológico propuesto, representa la realidad a la perfección.

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar la contribución de la biomasa al balance de DQO en agua que comprende:
   a. obtener una muestra de agua,
   b. determinar los porcentajes de los grupos bacterianos y materia inerte de la muestra obtenida en (a) mediante técnicas microbiológicas moleculares,
   c. determinar los siguientes parámetros de la muestra de agua obtenida en (a); DQO total (DQO_T), DQO soluble (DQO_{SOL}), DQO suspendida (DQO_{SUSP}), DBO límite total (DBO_{LT}), DBO límite soluble ($DBO_{L\ SOL}$), tiempo de retención de sólidos (SRT) y tiempo de resistencia hidráulico (HRT),
   d. determinar el balance de DQO utilizando los parámetros obtenidos en (c) y
   e. determinar la contribución de cada grupo bacteriano y materia inerte según (b) al balance de DQO calculado en (d).

2. Método según la reivindicación 1 donde la determinación del balance de DQO del paso (d) y la contribución de cada grupo bacteriano y materia inerte se lleva a cabo mediante una ecuación que comprende,

$$DQO_{\ SUSP} = X_H + X_A + X_{PAO} + X_I + X_{I0}\frac{SRT}{HRT}$$

X_H, X_A y X_{PAO} representan la DQO debida a la presencia de bacterias heterótrofas, autótrofas, PAO y materia suspendida inerte, respectivamente. X_{I0} es la DQO debida a la materia suspendida inerte aportada por el agua que entra a un sistema.

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde la muestra de agua es agua residual.

4. Método según la reivindicación 3 donde el agua residual procede de instalaciones para el tratamiento de aguas residuales basado en un sistema de fangos activados.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde la determinación de los porcentajes de los grupos bacterianos y materia inerte comprende:
    a. marcar las bacterias de la muestra mediante técnicas FISH, tinción con DAPI y técnicas de viabilidad celular,
    b. adquirir imágenes de la fluorescencia emitida por las bacterias marcadas con las técnicas descritas en (a) y
    c. determinar las áreas ocupadas por los grupos bacterianos y materia inerte.

6. Método según la reivindicación 5 donde el marcaje de las bacterias mediante técnicas FISH se lleva a cabo con las sondas SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, con las sondas SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 5 y con las sondas SEQ ID NO: 6 a SEQ ID NO: 8.

7. Método según la reivindicación 5 donde, la determinación de las áreas ocupadas por los grupos bacterianos y materia inerte se lleva a cabo analizando las imágenes de, al menos, 20 campos por muestra.

8. Programa de ordenador caracterizado porque comprende instrucciones de programa para provocar que un sistema de computación realice un método que comprende:
    a. adquirir imágenes de fluorescencia emitida según la reivindicación 6 (b) de, al menos, 20 campos por muestra,
    b. determinar las áreas medias de los grupos de bacterias y materia inerte de las imágenes adquiridas en (a) y
    c. determinar el balance de DQO y la contribución de cada grupo bacteriano y materia inerte al balance de DQO.

9. Programa de ordenador según la reivindicación 8 donde la determinación del balance de DQO y la contribución de cada grupo bacteriano y materia inerte al balance de DQO se lleva a cabo según la ecuación de la reivindicación 2.

10. Programa de ordenador según la reivindicación 9, caracterizado porque está almacenado en unos medios de grabación.

11. Programa de ordenador según la reivindicación 10, caracterizado porque es portado por una señal portadora eléctrica.

5

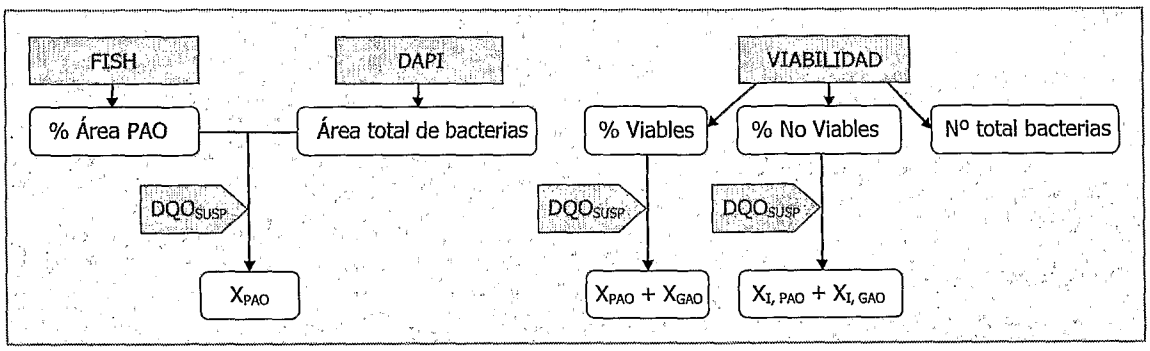

FISH
DAPI
VIABILIDAD
% Área PAO
Área total de bacterias
% Viables
% No Viables
Nº total bacterias
DQOSUSP
DQOSUSP
DQOSUSP
XPAO
XPAO + XGAO
XI, PAO + XI, GAO

FIG. 1

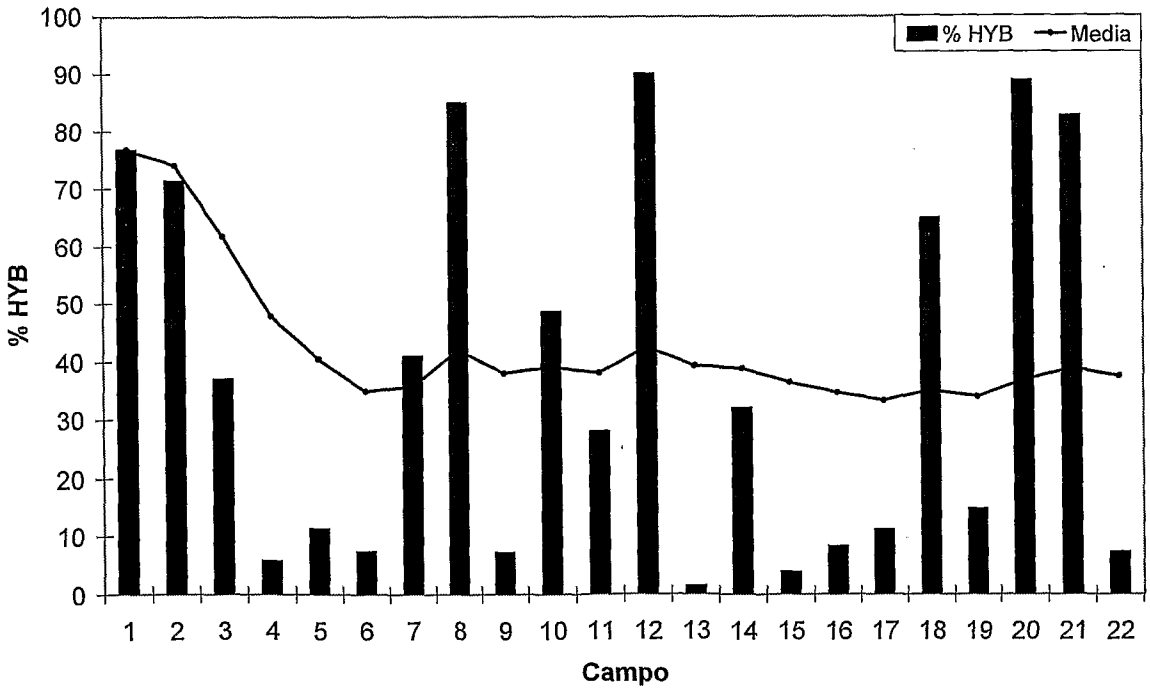

% HYB
Media
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% HYB
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22
Campo

FIG. 2

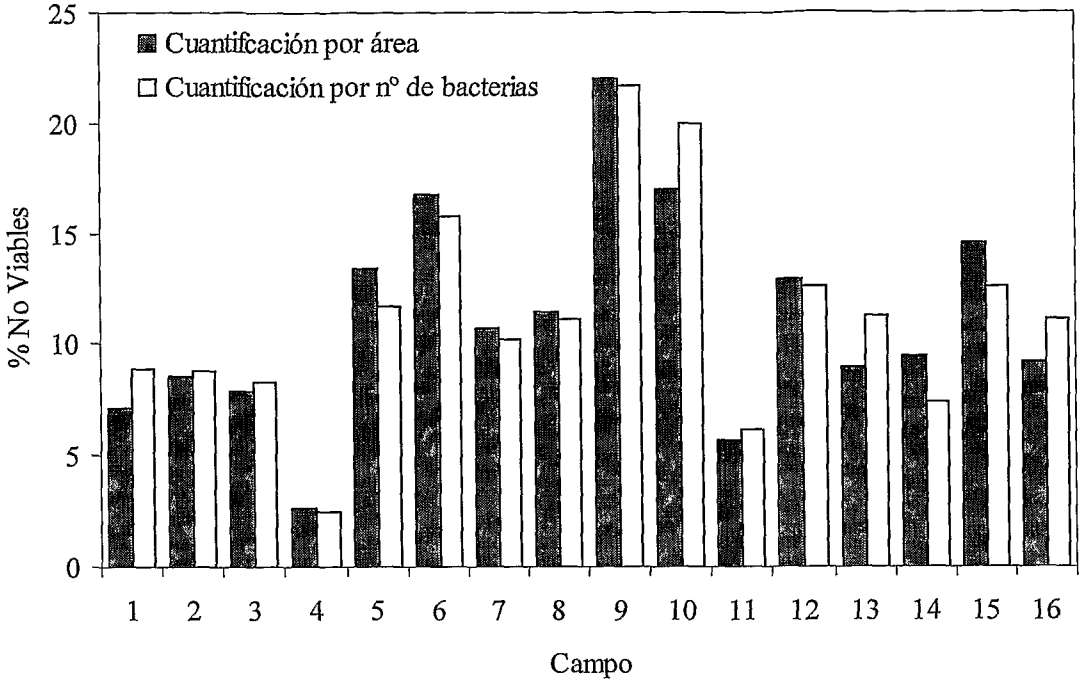

Cuantifcación por área
Cuantificación por nº de bacterias
% No Viables
25
20
15
10
5
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
Campo

FIG. 3

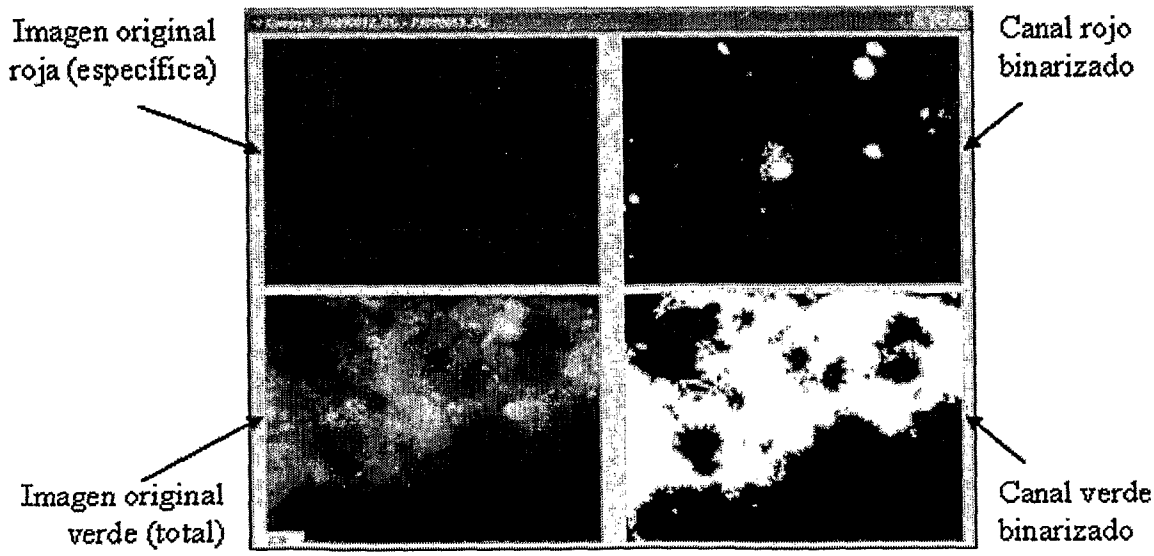

Imagen original roja (específica)
Canal rojo binarizado
Imagen original verde (total)
Canal verde binarizado

FIG. 4

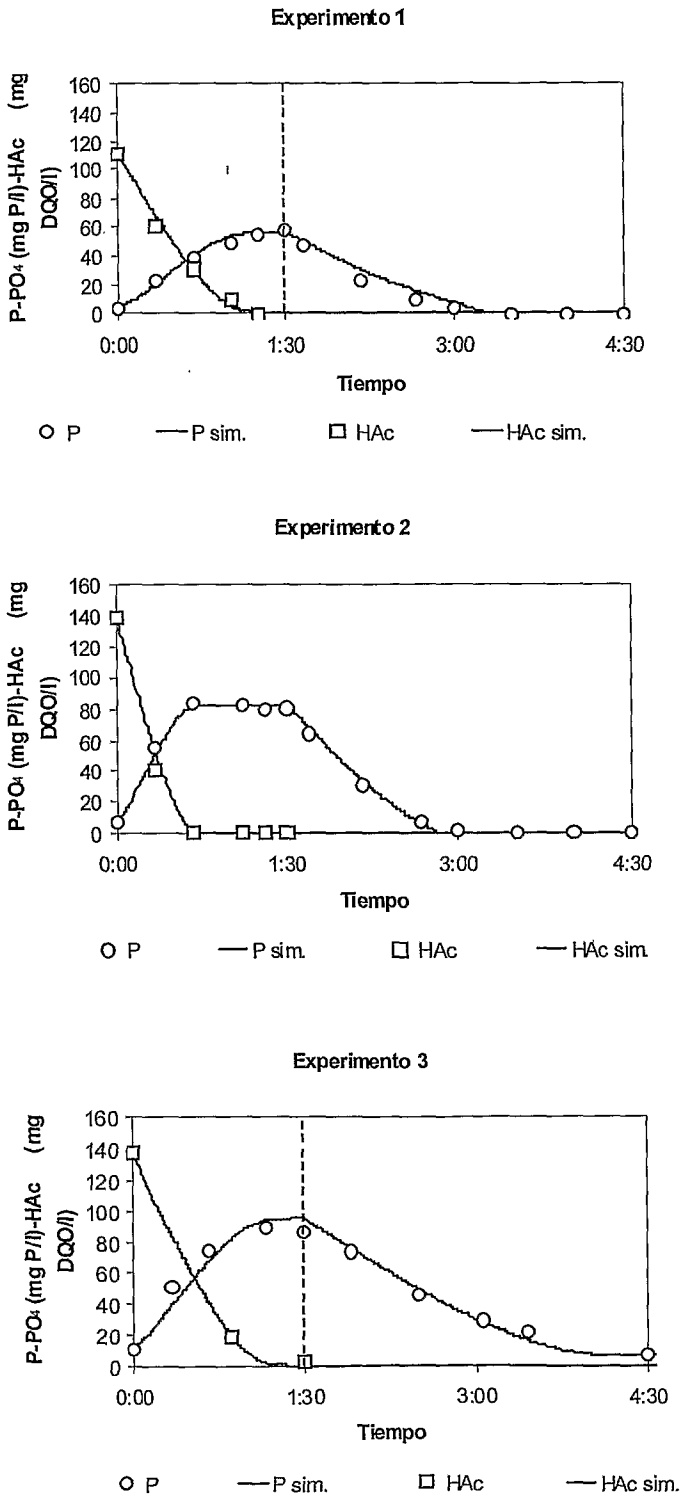

Experimento 1
P-PO4 (mg P/l)-HAc (mg DQO/l)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0:00
1:30
3:00
4:30
Tiempo
P
P sim.
HAc
HAc sim.
Experimento 2
P-PO4 (mg P/l)-HAc (mg DQO/l)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0:00
1:30
3:00
4:30
Tiempo
P
P sim.
HAc
HAc sim.
Experimento 3
P-PO4 (mg P/l)-HAc (mg DQO/l)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0:00
1:30
3:00
4:30
Tiempo
P
P sim.
HAc
HAc sim.

FIG. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2009/000488

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
GO1N, C02F, C12Q, G09B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES,EPODOC, WPI, XPESP, NPL, BIOSIS, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Munch E V. and Pollard P C. Measuring Bacterial Biomass-COD in wastewater containing Particulate Matter. Wat. Res. (1997); Vol. 31. nº 10. pp.. 2550-2556	1,3-11 2
Y	Yu Guangping et al. "On Simplified Model for Activated Sludge Wastewater Treatment Process and Simulation Based on Benchmark". Proc. 26th Chinese Control Conference; Jul. 26-31, 2007, Zhangjiajie, Human, China, pp. 182-186	2
Y	Jianbo Chen, et al. "Integrated Modeling and Simulation of Activated Sludge Process". Proc. 25th Chinese Control Conference; Aug. 7-11, 2006, Harbin, Heilongjiang, China, pp. 1382-1386	2

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
05 February 2010 (05.02.2010)	**(10/02/2010)**
Name and mailing address of the ISA/ O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. Facsimile No. 34 91 3495304	Authorized officer A. Martín-Falquina Garre Telephone No. +34 91 349 54 83

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2009/000488

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.: **8-11**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although this International Searching Authority carried out the search and produced the corresponding international search report, it should be noted that significant aspects of the claimed invention are covered by the provisions of PCT Rule 39, in particular with regard to schemes, rules or methods for performing purely mental acts, mere presentations of information and programs

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The technical subject matter in claims 1-7 and 8-11 is so different that there is no recognisable technical relationship that links these groups of inventions under a single general inventive concept (PCT Rule 13.1).

(see additional sheet)

1. [X] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

The application lacks unity of invention, since it includes more than one invention or group of inventions, as follows:

1. A method for determining the contribution of biomass to the COD balance in water samples, said method involving determining the percentages of the bacterial groups and inert material in a water sample using molecular microbiology techniques and incorporating the data obtained into a COD balance equation (claims 1-7);

2. A computer program to enable a computer system to determine the COD balance and the contribution of various bacterial groups and inert materials to the COD balance in water samples by capturing images of the fluorescence emitted by the marked bacteria, and corresponding process (claims 8-11).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2009/000488

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/18 (2006.01)
G09B 25/02 (2006.01)
C02F 3/12 (2006.01)
C12Q 1/06 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional Nº

PCT/ ES 2009/000488

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

GO1N, C02F, C12Q, G09B

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES,EPODOC, WPI, XPESP, NPL, BIOSIS, INSPEC

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones Nº
X	Munch E V. and Pollard P C. Measuring Bacterial Biomass-COD in wastewater containing Particulate Matter. Wat. Res. (1997); Vol. 31. nº 10. pp.. 2550-2556	1,3-11
Y		2
Y	Yu Guangping et al. "On Simplified Model for Activated Sludge Wastewater Treatment Process and Simulation Based on Benchmark". Proc. 26th Chinese Control Conference; Jul. 26-31, 2007, Zhangjiajie, Human, China, pp. 182-186	2
Y	Jianbo Chen, et al. "Integrated Modeling and Simulation of Activated Sludge Process". Proc. 25th Chinese Control Conference; Aug. 7-11, 2006, Harbin, Heilongjiang, China, pp. 1382-1386	2

☐ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
05 Febrero 2010 (05.02.2010)	**10-FEBRERO-2010 (10/02/2010)**
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. Nº de fax 34 91 3495304	Funcionario autorizado A. Martín-Falquina Garre Nº de teléfono +34 91 349 54 83

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional Nº

PCT/ ES 2009/000488

Recuadro II **Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)**

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☒ Las reivindicaciones Nºs: 8-11
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
Aún cuando esta Autoridad de Búsqueda Internacional ha realizado la búsqueda y emitido el correspondiente Informe de Búsqueda Internacional, se debe señalar que aspectos significativos de la invención reivindicada coinciden con materias relacionadas con la Regla 39 del Reglamento del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes, en particular en lo que hace referencia a planes, principios o métodos para actos puramente intelectuales, a las simples presentaciones de información y a los programas

2. ☐ Las reivindicaciones Nºs:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

3. ☐ Las reivindicaciones Nºs:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

Recuadro III **Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)**

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:
El objeto técnico de las reivindicaciones 1-7 y 8-11 es tan diferente que no se puede apreciar ninguna relación técnica que integre este grupo de invenciones bajo un único concepto inventivo general según la regla 13.1 del PCT. (ver hoja adicional)

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.

2. ☒ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.

3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones Nºs:

4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones Nºs:

Indicación en cuanto a la protesta

☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.

☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido en el requerimiento.

☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional Nº

PCT/ ES 2009/000488

La solicitud de patente no tiene unidad de invención ya que comprende más de una sola invención o grupos de invenciones descritos a continuación:

1.- Un método para determinar la contribución de la biomasa al balance de DQO en muestras de agua que comprende determinar los porcentajes de los grupos bacterianos y materia inerte de una muestra de agua mediante técnicas microbiológicas moleculares e incorporar los datos obtenidos en una ecuación del balace de DQO (Reivindicaciones 1-7).

2.- Un programa de ordenador para que un sistema de computación realice la determinación del balance de DQO y la contribución de distintos grupos bacterianos y materia inerte al balance de DQO en muestras de agua mediante la adquisición de imágenes de la fluorescencia emitida por las bacterias marcadas y su correspondiente procesado (Reivindicaciones 8-11).

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional Nº

PCT/ ES 2009/000488

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N 33/18 (2006.01)
G09B 25/02 (2006.01)
C02F 3/12 (2006.01)
C12Q 1/06 (2006.01)