

# Impacto de los recientes avances en el análisis de comunidades microbianas sobre el control del proceso de tratamiento de efluentes

LEONARDO ERIJMAN\*, EVA L. M. FIGUEROLA, LEANDRO D. GUERRERO, JOAQUÍN M. AYARZA

*Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET). Vuelta de Obligado 2490, (1428) Buenos Aires, Argentina*

*\*Correspondencia. E-mail: erijman@dna.uba.ar*

## RESUMEN

Una de las funciones principales de la biotecnología ambiental es ocuparse del estudio de comunidades microbianas que proveen servicios esenciales para la sociedad. Más allá de las similitudes que presenta con la microbiología industrial y la agrícola, la biotecnología ambiental presenta peculiaridades, tales como los objetivos de proceso, las características de la biomasa y el tipo y modo de alimentación (sustratos), que la distinguen claramente de las otras disciplinas relacionadas. En este artículo se reseñan recientes avances en la ecología microbiana, la ecofisiología, la genómica y la ingeniería de procesos, para ilustrar cómo la integración de los nuevos conocimientos permite superar las limitaciones del análisis microbiológico clásico para entender, predecir y optimizar el funcionamiento de los procesos de tratamiento de efluentes.

**Palabras clave:** lodos activados, dinámica de comunidades microbianas, ensamblado de comunidades microbianas, tratamiento de efluentes, metagenómica, nitrificación

## ABSTRACT

**Impact of the recent advances in the analysis of microbial communities on the control of the wastewater treatment process.** One of the main functions of environmental biotechnology is to address the study of microbial communities that provide essential services to society. Beyond the similarities with industrial and agricultural microbiology, the unique features exhibited by environmental biotechnology, such as process objectives, biomass characteristics and type and mode of feeding (substrates), allow a clear distinction from the other related disciplines. Recent advances in microbial ecology, ecophysiology, genomics and process engineering are herein reviewed to illustrate how the integration of the new knowledge can help overcome the shortcomings of classic microbiological analyses to understand, predict and optimize the performance of wastewater treatment.

**Key words:** activated sludge, community dynamics, community assembly, wastewater treatment, metagenomics, nitrification

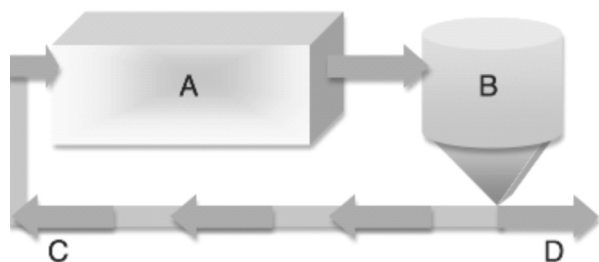
## INTRODUCCIÓN

El tratamiento de efluentes es una actividad de vital importancia para mantener la calidad y biodiversidad de los ecosistemas acuáticos, por su función en la reducción de la demanda de oxígeno y nutrientes en los líquidos descargados en el ambiente. Por ser los principales responsables de las transformaciones bioquímicas, los microorganismos son claves en el éxito del tratamiento, de allí la necesidad de su control para lograr un adecuado proceso de depuración (8).

El sistema más utilizado para el tratamiento de efluentes es el llamado proceso de lodos activados, donde una mezcla compleja de microorganismos crece en reactores aireados oxidando la materia orgánica biodegradable, que es transformada en biomasa microbiana y CO<sub>2</sub>, a la vez que elimina nutrientes como fósforo y nitrógeno, o los

convierte en formas menos nocivas (33). En su configuración más básica, el proceso de lodos activados consiste en: A) un reactor aeróbico, en donde la biomasa crece oxidando la materia orgánica biodegradable; B) un tanque de sedimentación, en donde la biomasa es separada antes de la descarga del líquido tratado, lo que produce un efluente depurado con bajo contenido de sólidos suspendidos; C) un sistema de recirculación mediante el cual se realimenta el reactor aeróbico, para mantener una alta relación entre biomasa activa y materia contaminante; y D) un sistema de eliminación del lodo excedente, que permite regular la cantidad de biomasa presente en el sistema de tratamiento (Figura 1).

Los componentes biológicos activos en las plantas de tratamiento son bacterias, hongos, protozoos y algunos metazoos (11). Las bacterias comprenden aproximadamente el 95 % de la biomasa y son los constituyentes

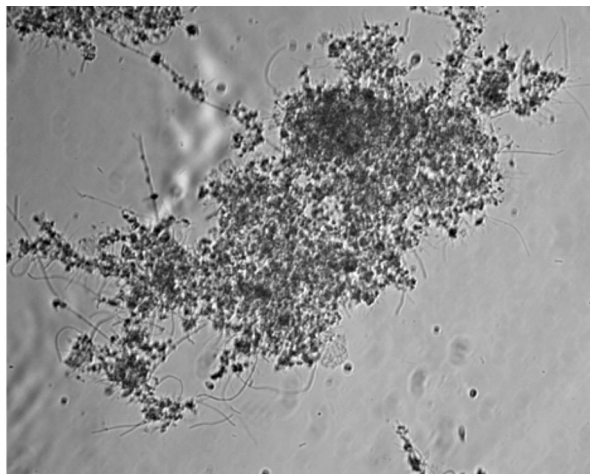


**Figura 1.** Esquema del proceso de lodos activados. A: Reactor aeróbico; B: Tanque de sedimentación; C: Recirculación de lodos; D: Eliminación de lodos excedentes.

que llevan a cabo la mayoría de las transformaciones de la materia orgánica contenida en los efluentes (85). Es importante destacar que en un sistema de lodos activados, el éxito del tratamiento no solo consiste en la biodegradación de la materia orgánica, sino que también depende del desarrollo de una biomasa floculenta capaz de sedimentar y compactarse adecuadamente (32). Por su tamaño, las bacterias se comportan como sólidos coloidales, que en un sedimentador convencional se mantienen en suspensión. En consecuencia, para que se produzca su sedimentación las bacterias deben flocular formando un agregado de mayor densidad denominado "floc" (66). El floc de lodos activados se compone de colonias microbianas embebidas en una nube de extracelular poliméricas (EPS, por sus siglas en inglés), que le provee resistencia y cohesión (46, 60, 89, 90) (Figura 2). Las EPS son proteínas, hidratos de carbono, sustancias húmicas, ácidos nucleicos y lípidos, que derivan de los propios microorganismos y son producidos por lisis celular o por transporte activo (70, 91).

El control del proceso de barros activados se puede conseguir actuando sobre una o más de las tres principales variables operativas: la cantidad de aireación suministrada, la cantidad de lodo reciclado al tanque aeróbico de lodos activados y la cantidad de lodo eliminado del sistema. Para obtener una indicación del estado del proceso, en la mayoría de las plantas de lodos activados se realiza con una frecuencia determinada (por ejemplo, en forma diaria) una medición de las características de sedimentación del floc biológico. Este ensayo proporciona una medida cualitativa de la capacidad de separación de fases sólido-líquido y al mismo tiempo permite, en conjunto con la medida de sólidos suspendidos (volátiles), obtener una apreciación semicuantitativa del volumen de lodos en el proceso (38).

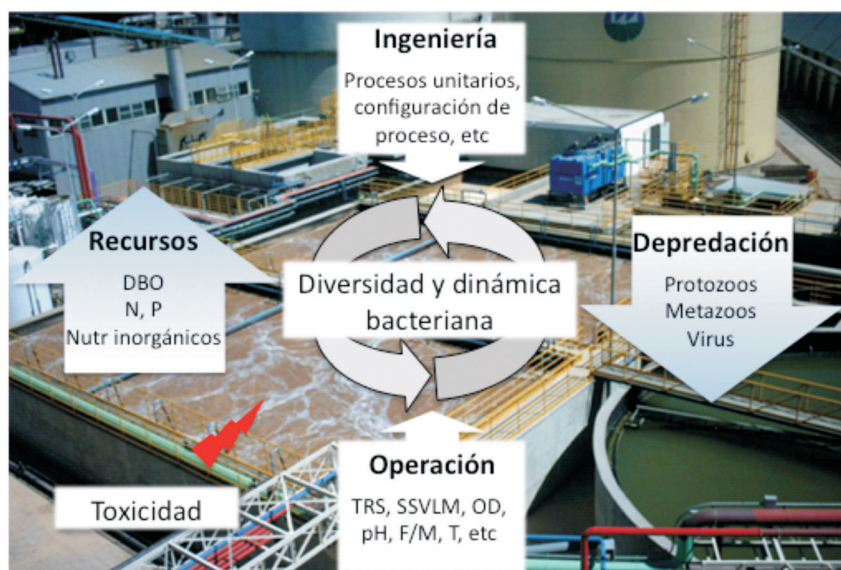
Por otra parte, como la capacidad de degradación de materia orgánica y la estabilidad estructural del floc dependen en gran medida de la estructura de la comunidad microbiana, el conocimiento de la microbiología del ecosistema de tratamiento ocupa un lugar central en el control del proceso (92). En este sentido, el monitoreo y diagnóstico microbiológico de los procesos se concentra



**Figura 2.** Microfotografía de un floc de lodos activados. Magnificación original: 200X.

en la cuantificación de las bacterias totales y heterótrofas (54) y en el análisis microscópico de la sucesión de comunidades eucariotas desarrolladas durante la maduración de la biomasa activa. Los sistemas biológicos de tratamiento de efluentes son ecosistemas en los que ocurren múltiples interacciones, que pueden explicarse con modelos ecológicos clásicos (23). Cada proceso de tratamiento posee su microbiota característica, producto de una cadena alimenticia influenciada por la disponibilidad de recursos y la depredación entre distintos niveles tróficos. Algunas observaciones empíricas sugieren que los tiempos de retención de sólidos (TRS) en los sistemas de tratamiento deben superar un cierto umbral para que ocurra la biofloculación. En lodos activados, se postula que esta observación permite vincular la sucesión de microorganismos eucariotas como protozoos (flagelados, ciliados) y metazoos (rotíferos, nematodos) con las condiciones de carga orgánica, el estado nutricional del sistema y la producción de EPS por las bacterias (88). En general, los protozoos tienen una tasa de crecimiento máxima menor que las bacterias, y el TRS por debajo del cual no hay biofloculación corresponde al mínimo TRS requerido para el crecimiento de los protozoos. Sin embargo, las poblaciones de microorganismos en las plantas de tratamiento de efluentes también se ven afectadas por muchos otros factores, tanto físicos como químicos. Se citan entre los primeros la temperatura (55) y el tiempo de retención hidráulica (64), y entre los segundos el pH (42), el oxígeno disuelto (51), la salinidad (98), la presencia de tóxicos (12, 77) y la concentración de nutrientes orgánicos (61) e inorgánicos (44) (Figura 3). Por ello, en la mayoría de los casos la simple observación microscópica no provee la información suficiente para ayudar a la toma de decisión respecto de medidas efectivas de control de proceso.

A estas limitaciones metodológicas se les suma el significativo déficit de recursos humanos capacitados en



**Figura 3.** Factores que influyen sobre la microbiota en una planta de lodos activados. La diversidad y dinámica de las comunidades bacterianas está regulada por factores que incluyen las condiciones ambientales, la disponibilidad de recursos y las relaciones de depredación.

tareas de saneamiento ambiental en los países de nuestra región. Es por ello que, en la práctica, la aplicación de métodos convencionales de control ha resultado de dudosa eficacia para enfrentar con éxito los desafíos de mantener la operación de los sistemas de tratamiento en forma confiable y segura.

Con el objetivo de mejorar el desarrollo de nuevas metodologías de control, se han propuesto protocolos para obtener medidas de eficiencia basadas en simulaciones numéricas (1, 14). También se han propuesto estrategias que contrastan entre los extremos de un enfoque puramente “artesanal”, basado en la experiencia del operador de planta y de sus propias percepciones visuales y olfativas (67), y de sofisticados análisis multivariados basados en comparaciones estadísticas con datos históricos de la planta de tratamiento (2), o en la evaluación del ciclo de vida o LCA (*life cycle assessment*) (25).

¿Cuál es el lugar que ocupa la microbiología en este contexto?

A la luz de los nuevos conocimientos surgidos de la ecología microbiana, la ecofisiología, la genómica y la ingeniería de procesos, proponemos que el microbiólogo debe intervenir activamente en el control del proceso, superando las limitaciones del análisis microbiológico clásico mediante la aplicación de un enfoque más integral, que le permita entender, predecir y optimizar el funcionamiento de los procesos de tratamiento de efluentes. A tal fin, es importante tener en cuenta algunos aspectos que caracterizan a las comunidades microbianas de las plantas de tratamiento:

*Las comunidades microbianas en las plantas de tratamiento son diversas.* La inmensa diversidad genética y metabólica que poseen los microorganismos les permite

catalizar las transformaciones indispensables para la degradación de casi todos los contaminantes orgánicos conocidos. La extensa lista de aislamientos obtenidos a lo largo de décadas de investigación aplicada y, más recientemente, el uso de técnicas de análisis independientes del cultivo han posibilitado la identificación de numerosos microorganismos potencialmente relevantes para el tratamiento de efluentes (12, 26-28, 59, 71, 83, 84, 96). Sin embargo, aún no es posible construir *de novo* una comunidad artificial que posea la capacidad y versatilidad para llevar a cabo los pasos necesarios para depurar efluentes reales a partir de cepas aisladas. Por el contrario, el diseño de sistemas de tratamiento consiste en establecer condiciones apropiadas que seleccionen y mantengan poblaciones funcionalmente activas. La selección ecológica se produce como resultado de presiones abióticas, ejercidas por las condiciones ambientales y sus fluctuaciones (temperatura, pH, clase y concentración de fuentes de carbono y otros nutrientes, aceptores de electrones, tiempos de retención de sólidos, presencia de compuestos tóxicos), y de factores bióticos, como las interacciones de los microorganismos entre sí y la presencia de bacteriófagos y depredadores. Como resultado, las plantas de tratamiento se comportan como sistemas complejos, donde muchos tipos de diferentes microorganismos crecen e interactúan de forma dinámica.

La visión clásica sobre la regulación de la estructura de la comunidad bacteriana se remonta a la famosa declaración de que “todo está en todas partes, el medio ambiente selecciona” (20). Una visión alternativa no presupone una correspondencia entre las condiciones ambientales y la estructura de la comunidad, sino que postula que la composición de las comunidades bacterianas es producto de

eventos estocásticos, relacionados con el reclutamiento de especies funcionalmente equivalentes tomadas de la comunidad regional o "metacomunidad" (75). Algunos estudios recientes realizados en nuestro laboratorio y en otros indican que ambos modos de ensamblado operan en forma simultánea (58), y que el balance entre ambos puede depender de la composición del efluente (81) y del número de especies (riqueza) de la metacomunidad (3, 4).

Al igual que la mayoría de los sistemas microbianos complejos, las plantas de tratamiento de efluentes presentan un alto número de especies de baja abundancia (16). La eficiencia de los sistemas de tratamiento no depende de la presencia de especies individuales, sino que se mantiene en las condiciones fluctuantes del proceso gracias a la redundancia funcional de especies equivalentes (15). Esta diversidad es producto de procesos continuos de inmigración y diversificación (45). Por otra parte, no se ha demostrado fehacientemente que la introducción de cepas exógenas pueda aportar funciones que no se encuentran presentes en los sistemas autóctonos. El corolario es que en la práctica, la intervención del operador del proceso de tratamiento debería orientarse a la maximización de la diversidad, más que a la introducción de cepas individuales o grupos de cepas que posean funciones particulares. Establecer la incidencia de la diversidad microbiana en el mantenimiento de la estabilidad funcional de un sistema de tratamiento de efluentes es esencial para determinar cómo se pueden manipular los regímenes operativos hacia el objetivo de asegurar la estabilidad de los procesos.

*Las comunidades microbianas en las plantas de tratamiento son dinámicas.* Al igual que la mayoría de los ecosistemas, las plantas de tratamiento de efluentes no están en equilibrio. Los procesos de tratamiento están sujetos a cambios continuos en las variables claves de operación, debido a las variaciones constantes en el caudal y la concentración de los efluentes que tratan. En forma concomitante, las poblaciones microbianas y la actividad biológica se ajustan continuamente a las nuevas condiciones ambientales. No obstante, una observación frecuente en sistemas de tratamiento de efluentes es que pueden funcionar eficientemente en forma estable, aun cuando se produzcan al mismo tiempo cambios permanentes en la composición de sus comunidades microbianas (5, 6). Por otra parte, es posible que las fluctuaciones en la composición de las comunidades microbianas presentes en las plantas de tratamiento de efluentes se deban a su comportamiento caótico (40). El caos es un comportamiento dinámico irregular que, en apariencia, es ocasionado por causas aleatorias externas al sistema pero que, en realidad, es la consecuencia de factores internos de carácter determinístico, es decir, que obedecen a reglas determinadas, propias del sistema. Dichos factores pueden estar relacionados con la interacción de las poblaciones con los recursos disponibles, con sus competidores y con sus depredadores (56).

La falta de predicción inherente al comportamiento caótico no debe confundirse con inestabilidad funcional (15). Por el contrario, se ha sugerido que sistemas al borde del caos son capaces de exhibir un grado de organización que promueve un funcionamiento exitoso en presencia de leves perturbaciones (76). De hecho, se ha demostrado que la ocurrencia de caos es clave en la estabilidad de la nitrificación, debido a la frágil relación mutualista entre las bacterias oxidantes de amonio y las bacterias oxidantes de nitrito (conocidas como AOB y NOB, respectivamente, por sus siglas en inglés) (34). El fenómeno de caos determinístico es muy difícil de probar experimentalmente. Sin embargo, entender que ciertas fluctuaciones poblacionales pueden deberse a un comportamiento caótico, o sea, que no son necesariamente producto de perturbaciones externas, tiene importantes consecuencias operativas. En la práctica, el operador debe analizar qué relación existe entre dichas fluctuaciones y la estabilidad global del proceso, y a partir de allí, decidir si en algunos casos será conveniente dejar desarrollar el proceso sin intervenir, en lugar de aplicar medidas correctivas que puedan desestabilizarlo.

*Ecofisiología en la era genómica.* La aplicación de técnicas proteogenómicas está abriendo nuevas perspectivas sobre la fisiología y evolución de los microorganismos que cumplen funciones esenciales en los procesos de tratamiento de efluentes (18, 73).

La cepa CB2 de *Acidovorax temperans* es una bacteria que se ha encontrado en baja abundancia en sistemas de tratamiento de efluentes, creciendo en microcolonias o como células individuales. Estas modalidades de crecimiento corresponden a dos formas distintas, que poseen diferentes propiedades en términos de formación de floc y biofilm. La relevancia de esta cepa para el tratamiento de efluentes se origina en el hecho de que las propiedades de agregación determinan a su vez las características de sedimentación. Por ello, *Acidovorax temperans* CB2 se ha tomado como un organismo modelo para la formación de floc (36). La secuenciación completa de su genoma, de 4,2 Mb, reveló que las interacciones célula-célula en la formación de biofilm se encuentran mediadas por numerosos factores. Entre ellos se citan señales nutricionales, ADN extracelular, exopolisacáridos y estructuras como los pili (80).

Durante las últimas dos décadas, ha cobrado gran interés el problema de la cultivabilidad de las bacterias ambientales. Inicialmente muchos autores se refirieron a las bacterias cuya presencia era detectada con métodos moleculares (principalmente basados en las secuencias del gen codificante para la subunidad 16S del ARN ribosomal), pero que no podían ser crecidas en cultivos sintéticos, como bacterias "no cultivables". Evidentemente, con este término no se describe con precisión a un grupo determinado de microorganismos, ya que muchas de estas bacterias fueron posteriormente aisladas en cultivo

aplicando métodos y medios de cultivo novedosos (7, 10, 19, 22, 31, 57, 78, 82).

Sin embargo, la mayoría de los microorganismos existentes aún no han podido ser cultivados, incluso aquellos activos en sistemas de tratamiento de efluentes (30). Además de la dificultad de encontrar en medios sintéticos las condiciones abióticas que simulen totalmente aquellas que el microorganismo encuentra en su ambiente natural, el aislamiento también interrumpe la interacción que ocurre a distintos niveles entre el microorganismo de interés y otros miembros de la comunidad microbiana (62). Por ello, el subgrupo de microorganismos cultivables presentes en un ambiente no refleja adecuadamente las propiedades integrales de las comunidades de las que provienen (97).

Un caso paradigmático es el de las bacterias claves en la remoción de nutrientes de los efluentes. Durante mucho tiempo se consideró que los pasos de oxidación de amonio y de oxidación de nitrito se debían a la actividad exclusiva de bacterias pertenecientes a los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, respectivamente. Esta información proviene de experimentos realizados en la década de los sesenta sobre cultivos puros, y aún se incluye en numerosos libros de texto y cursos de la especialidad (8, 35, 86). Sin embargo, los datos obtenidos en los últimos 15 años utilizando técnicas independientes del cultivo permitieron demostrar que la diversidad de bacterias oxidantes de amonio es mucho mayor que lo que se creía (29, 53). Esto motivó que un gran número de investigaciones se orientara, en los últimos años, a comprender la ecofisiología de la oxidación de amonio y de nitrito en plantas de tratamiento de efluentes. Aunque se ha confirmado que *Nitrosomonas europaea* es abundante en algunos reactores que tratan efluentes industriales con alto contenido de nitrógeno amoniacal (24), en muchos otros casos las bacterias oxidantes de amonio mayoritarias son especies del género *Nitrosococcus*, como *Nitrosococcus mobilis*, especialmente en plantas de tratamiento de efluentes municipales (39). En lo que respecta a la oxidación de nitrito, los métodos independientes del cultivo demostraron que las bacterias del género *Nitrospira* (y no las del género *Nitrobacter*) son los principales microorganismos responsables de la oxidación de nitrito en la mayoría de los sistemas de tratamiento de efluentes (68). Esta información es muy relevante, ya que se probó que existen significativas diferencias entre las respuestas de *Nitrobacter* y *Nitrospira* a las diferentes condiciones de crecimiento que se encuentran en las plantas de tratamiento. La diversidad de bacterias nitrificantes es, asimismo, mayor que la previamente conocida: se ha observado que distintas cepas del género *Nitrospira*, con preferencia por diferentes concentraciones de nitrito, coexisten en biofilms nitrificantes, en donde habitan micronichos a lo largo de gradientes de concentración de nitrito (17).

Recientemente se ha descubierto que un grupo de bacterias quimiolitautotróficas pertenecientes al filo *Planctomycetes* son capaces de catalizar la combinación

directa de amonio y nitrito, convirtiéndolos en nitrógeno gaseoso (74). Estas bacterias, aún no cultivadas, son abundantes y activas en nichos anóxicos en algunos sistemas de tratamiento de efluentes, con lo cual la oxidación anaeróbica de amonio (anammox) debe ser considerada como un tercer proceso, que se agrega a los conocidos pasos de nitrificación y desnitrificación en el ciclo de nitrógeno de efluentes. La identificación de los genes codificantes de las enzimas involucradas en la oxidación anaeróbica de amonio, obtenidos a partir de los genomas de las bacterias *Brocadia anammoxidans* y *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* (79), aportará en breve una plataforma efectiva para comprender mejor la ecofisiología del proceso anammox.

El conocimiento relativo a la eliminación biológica de fósforo de los efluentes ha seguido un recorrido similar al de la remoción de nitrógeno. El exceso de fósforo puede ser eliminado de los efluentes utilizando la capacidad de ciertas bacterias heterótrofas de acumular polifosfato en sus células. Las bacterias pertenecientes al género *Acinetobacter* spp. son capaces de acumular fósforo intracelular en cultivo, y se creyó durante mucho tiempo que eran los organismos responsables de la eliminación de fósforo en el efluente en el proceso de tratamiento (13). Actualmente se sabe que aunque *Acinetobacter* es un género bacteriano presente en las plantas de tratamiento, no cumple ningún papel de relevancia en la reducción de fósforo en sistemas reales (9). La eliminación biológica de fosfato de los efluentes se consigue a través de ciclos alternados de fases aeróbicas-anaeróbicas, en un proceso conocido como eliminación biológica de fósforo aumentada o EBPR (por su sigla en inglés). Estas condiciones imponen una ventaja selectiva a favor de un grupo de bacterias para acceder a los sustratos necesarios para el crecimiento. En forma genérica, estos organismos son conocidos como acumuladores de fosfato o PAO. Se han postulado varios candidatos como principales PAO en plantas de tratamiento de efluentes diseñadas para EBPR, pertenecientes a grupos taxonómicos diversos dentro de las clases Betaproteobacteria (género *Rhodocyclus*), Actinobacteria y Alphaproteobacteria. Las condiciones de ciclo aeróbico-anaeróbico presentes en los sistemas EBPR son frecuentemente selectivas para otro grupo de bacterias, que son capaces de acumular glucógeno (GAO), como por ejemplo las Gammaproteobacterias no cultivadas '*Candidatus Competibacter phosphatis*'. Estas compiten con los PAO por las fuentes de carbono, aunque no son capaces de reducir los niveles de ortofosfato de los efluentes (69).

*Ecología microbiana en la era metagenómica.* Los avances de la genómica de organismos de interés ambiental (72), extendidos inicialmente a la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica, continúan actualmente expandiéndose hacia las respectivas "meta-ómicas", es decir, a las "ómicas" de comunidades. A pesar de los enormes desafíos tecnológicos dados por la complejidad

de las comunidades compuestas por cientos o miles de microorganismos, los estudios metagenómicos, metatranscriptómicos y metaproteómicos están comenzando a proveer información sin precedentes para la comprensión de las relaciones entre estructura, función y dinámica de las comunidades microbianas. Las técnicas de secuenciación paralela masiva (por ejemplo, la pirosecuenciación) son herramientas de última generación que han permitido obtener inventarios de microorganismos con un nivel de profundidad que supera en más de dos órdenes de magnitud a los realizados hasta el presente, lo que reduce drásticamente los costos. La pirosecuenciación, técnica basada en la detección del pirofosfato liberado durante la incorporación de nucleótidos (49), ya ha sido aplicada en el contexto de la ecología microbiana para el análisis de la diversidad microbiana en varios ecosistemas, tales como suelos (43), minas (21), océanos (37), cavidades humanas (41) y alimentos fermentados (63). La técnica permite analizar aspectos relevantes de la estructura de la comunidad y se alcanzan niveles de resolución que no se logran con otras técnicas moleculares de análisis, especialmente por la detección de especies raras y poco abundantes.

Aplicada al estudio del tratamiento de efluentes, la pirosecuenciación ha revelado un altísimo nivel de diversidad genética en la comunidad microbiana de dichos sistemas. Los datos de alta resolución han permitido inferir cómo la estructura microbiana que interviene en los procesos de tratamiento es el resultado de fuertes mecanismos de selección ambiental. Se ha comprobado que las comunidades microbianas en los sistemas cloacales representan una combinación de microorganismos de origen fecal y de microorganismos enriquecidos en las condiciones de los desagües, lo que origina una estructura única (52). En el primer caso informado en la literatura científica, se describió que las secuencias de ARN ribosomal obtenidas del genoma de la comunidad (metagenoma) de una planta de tratamiento de efluentes del estado de North Carolina (EE.UU.), que trata 28 400 m<sup>3</sup> de efluente por día, pertenecían casi exclusivamente a bacterias provenientes de suelos y aguas dulces. Sorprendentemente, solo se encontró un número relativamente escaso de secuencias pertenecientes a microorganismos de origen intestinal, a pesar del inmenso volumen de efluente cloacal que ingresaba al sistema cada día (65). Estos resultados sugieren la existencia de una fuerte presión de selección, dada por las características ambientales del sistema de tratamiento, en contra de los microorganismos presentes en las heces humanas.

Por el contrario, la estabilidad de la estructura de la comunidad microbiana en los sistemas de tratamiento se encuentra al menos parcialmente determinada por la composición química del líquido que ingresa al sistema (47, 48, 81). Esto explica la existencia de un núcleo común de filos bacterianos con casi idéntica composición

en cinco plantas de tratamiento localizadas en diferentes regiones geográficas, según lo indica un reciente estudio genómico basado en microarreglos de alta densidad (95).

Naturalmente, la diversidad genética excede la diversidad taxonómica y cumple un papel esencial en el mantenimiento de la estabilidad funcional de los ecosistemas de plantas de tratamiento. Esto ha sido verificado en estudios metaproteómicos, en los que se identificaron los caminos metabólicos claves en la eliminación biológica de fósforo mediada por '*Candidatus Accumulibacter phosphatis*' (93, 94).

*Ingeniería de bioprocesos.* Posiblemente, lo más importante para recordar cuando se evalúa un proceso de tratamiento de efluentes es que su eficiencia depende de una combinación de factores y que cada uno de los procesos unitarios (etapa anóxica, etapa aeróbica, sedimentación, recirculación) es parte de un sistema. Por lo tanto, no solamente se debe considerar el factor de escala, sino que los conceptos de ingeniería de procesos deben ser también incorporados para alcanzar el éxito de los servicios asociados.

La eficiente agregación y adecuada sedimentación es esencial para la generación de efluentes de buena calidad. Muy frecuentemente, la separación de los flocs por sedimentación resulta el paso limitante en el procesamiento de los efluentes. Uno de los problemas más comunes de separación de sólidos está relacionado con la proliferación excesiva de bacterias filamentosas. Para intentar explicar las causas de este fenómeno se han postulado una serie de hipótesis, pero hasta el momento, no existen pruebas que validen ningún mecanismo general (50).

Los métodos específicos para el control de bacterias filamentosas tienen el propósito de favorecer el crecimiento de bacterias formadoras de floc a expensas de estructuras filamentosas. El desafío es adecuar las condiciones ambientales en los reactores de tratamiento para que resulten apropiadas en términos de este objetivo. Existen suficientes indicios que sugieren que la presencia de gradientes de concentración de nutrientes en los flocs evitaría la ventaja ecológica y morfológica de las bacterias filamentosas. En este contexto, la configuración del proceso es clave, ya que estos gradientes pueden ser logrados utilizando concentraciones suficientemente altas de aceptores y donadores de electrones, por ejemplo, mediante la adaptación de los reactores a condiciones hidráulicas de flujo pistón. En este tipo de configuración se crea un perfil con una concentración de sustrato decreciente a lo largo del reactor. El gradiente de sustrato selecciona las bacterias formadoras de floc en la primera zona del reactor, cerca del ingreso, en la cual los sustratos se encuentran en alta concentración. Como la mayor parte de los sustratos orgánicos son eliminados cuando su concentración es alta, el resultado es una selección cinética que favorece a las bacterias formadoras de floc por sobre las bacterias filamentosas (38).

Si bien la composición microbiana del floc y la actividad de las especies que lo integran determinan su estructura, es importante entender que no en todos los casos los problemas de separación de sólidos tienen origen biológico. A veces existen problemas hidrodinámicos en los sedimentadores, que son el resultado de flujos no ideales causados por la geometría del ingreso y egreso del líquido al sedimentador, el efecto de turbulencias, la presencia de zonas muertas y las corrientes de densidad originadas por las diferencias de sólidos suspendidos y temperatura dentro del tanque sedimentador (87).

**Conclusiones.** Los sistemas de tratamiento son ecosistemas complejos caracterizados por redundancia funcional, alta diversidad y dinamismo, aspectos no capturados por los monitoreos clásicos. La mayoría de los resultados reseñados en este artículo han sido obtenidos utilizando herramientas de análisis que no son de rutina en un laboratorio de microbiología. No obstante, los conceptos que aportan son, en principio, generalizables a otros sistemas con similares objetivos de proceso. Por lo tanto, mediante la comprensión de los factores que determinan la estructura, dinámica y fisiología de los ecosistemas de tratamiento de efluentes, el microbiólogo dispone de conocimientos fundamentales para ayudar en la adopción de medidas correctivas y en la toma de decisiones que conduzcan a óptimas condiciones operativas.

**Agradecimientos:** Los autores agradecen a Susana Vázquez y a los revisores anónimos por valiosos comentarios sobre el manuscrito. La investigación realizada en el laboratorio es parcialmente financiada con subsidios de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2005-31705; PICT 2008-1950). Algunos de los conceptos volcados en este artículo provienen de la experiencia obtenida durante la ejecución de los Servicios Tecnológicos de Alto Nivel (STAN) de Consultoría en Ingeniería Ambiental (Resolución 1428/07 CONICET). L.E. y E.L.M.F. son investigadores del CONICET.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abusam A, Keesman KJ, Spanjers H, van Straten G. Benchmarking procedure for full-scale activated sludge plants. *Ctrl Eng Pract* 2004; 12: 315-22.
- Avella AC, Görner T, Yvon J, Chappe P, Guinot-Thomas P, de Donato P. A combined approach for a better understanding of wastewater treatment plants operation: Statistical analysis of monitoring database and sludge physico-chemical characterization. *Water Res* 2011; 41: 981-92.
- Ayarza JM, Erijman L. Balance of neutral and deterministic components in the dynamics of activated sludge floc assembly. *Microb Ecol* 2011; 61: 486-97.
- Ayarza JM, Guerrero LD, Erijman L. Nonrandom assembly of bacterial populations in activated sludge flocs. *Microb Ecol* 2010; 59: 436-44.
- Basile LA, Erijman L. Quantitative assessment of phenol hydroxylase diversity in bioreactors using a functional gene analysis. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008; 78: 863-72.
- Basile LA, Erijman L. Maintenance of phenol hydroxylase genotypes at high diversity in bioreactors exposed to step increases in phenol loading. *FEMS Microbiol Ecol* 2010; 73: 336-48.
- Ben Dov E, Kramarsky Winter E, Kushmaro A. An in situ method for cultivating microorganisms using a double encapsulation technique. *FEMS Microbiol Ecol* 2009; 68: 363-71.
- Bitton G. *Wastewater microbiology*. 3rd edition. Mitchell R, editor. Hoboken, NJ, Wiley-Liss, 2005.
- Blackall LL, Crocetti GR, Saunders AM, Bond PL. A review and update of the microbiology of enhanced biological phosphorus removal in wastewater treatment plants. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002; 81: 681-91.
- Bollmann A, Lewis K, Epstein SS. Incubation of environmental samples in a diffusion chamber increases the diversity of recovered isolates. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 6386-90.
- Burgess JE. Assessment of microbial populations in activated sludge using an organism diversity index. *J CIWEM* 2002; 16: 40-5.
- Caravelli A, Contreras EM, Giannuzzi L, Zaritzky N. Modeling of chlorine effect on floc forming and filamentous micro-organisms of activated sludges. *Water Res* 2003; 37: 2097-105.
- Cloete TE, Steyn PL. The role of *Acinetobacter* as a phosphorus removing agent in activated sludge. *Water Res* 1988; 22: 971-6.
- Copp JB. Defining a simulation benchmark for control strategies. *Water* 21 2000; April: 44-9.
- Curtis TP, Head IM, Graham DW. Theoretical ecology for engineering biology. *Environ Sci Technol* 2003; 37: 64A-70A.
- Curtis TP, Sloan WT. Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Curr Opin Microbiol* 2004; 7: 221-6.
- Daims H, Maixner F, Lucker S, Stoecker K, Hace K, Wagner M. Ecophysiology and niche differentiation of *Nitrospira*-like bacteria, the key nitrite oxidizers in wastewater treatment plants. *Water Sci Technol* 2006; 54: 21-7.
- Daims H, Taylor MW, Wagner M. Wastewater treatment: a model system for microbial ecology. *Trends Biotechnol* 2006; 24: 483-9.
- Davis KER, Joseph SJ, Janssen PH. Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 826-34.
- de Wit R, Bouvier T. 'Everything is everywhere, but, the environment selects'; what did Baas-Becking and Beijerinck really say? *Environ Microbiol* 2006; 8: 755-8.
- Edwards RA, Rodriguez-Brito B, Wegley L, Haynes M, Breitbart M, Peterson DM, Saar MO, Alexander S, Alexander EC, Rohwer F. Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. *BMC Genomics* 2006; 7: 57.
- Ferrari BC, Winsley T, Gillings M, Binnerup S. Cultivating previously uncultured soil bacteria using a soil substrate membrane system. *Nature Protocols* 2008; 3: 1261-9.
- Figuerola EL, Erijman L. Bacterial taxa abundance pattern in an industrial wastewater treatment system determined by the full rRNA cycle approach. *Environ Microbiol* 2007; 9: 1780-9.
- Figuerola EL, Erijman L. Diversity of nitrifying bacteria in a full-scale petroleum refinery wastewater treatment plant experiencing unstable nitrification. *J Hazard Mater* 2010; 181: 281-8.
- Flores-Alsina X, Gallego A, Feijoo G, Rodriguez-Roda I. Multiple-objective evaluation of wastewater treatment plant control alternatives. *J Environ Manage* 2010; 91: 1193-201.
- Gallego A, Gemini V, Rossi S, Fortunato MS, Planes E, Gúmez CE, Korol SE. Detoxification of 2, 4, 6-trichlorophenol by an indigenous bacterial community. *Intl Biodet Biodegrad* 2009; 63: 1073-8.
- Gallego A, Gemini VL, Fortunato MS, Dabas P, Rossi SL, Gómez CE, Vescina C, Planes EI, Korol SE. Degradation

- and detoxification of cresols in synthetic and industrial wastewater by an indigenous strain of *Pseudomonas putida* in aerobic reactors. *Environ Toxicol* 2008; 23: 664-71.
28. Garavaglia L, Cerdeira SB, Vullo DL. Chromium (VI) bio-transformation by beta- and gamma-Proteobacteria from natural polluted environments: a combined biological and chemical treatment for industrial wastes. *J Hazard Mater* 2010; 175: 104-10.
  29. Gieseke A, Bjerrum L, Wagner M, Amann R. Structure and activity of multiple nitrifying bacterial populations co-existing in a biofilm. *Environ Microbiol* 2003; 5: 355-69.
  30. Gilbride KA, Lee DY, Beaudette LA. Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. *J Microbiol Meth* 2006; 66: 1-20.
  31. Giovannoni SJ, Foster RA, Rappe MS, Epstein S. New cultivation strategies bring more microbial plankton species into the laboratory. *Oceanography* 2007; 20: 62-9.
  32. Govoreanu R, Seghers D, Nopens I, De Clercq B, Saveyn H, Capalozza C, Van der Meeren P, Verstraete W, Top E, Vanrolleghem PA. Linking floc structure and settling properties to activated sludge population dynamics in an SBR. *Water Sci Technol* 2003; 47: 9-18.
  33. Grady CPLJ, Daigger GT, Lim HC, *Biological Wastewater Treatment*. New York, NY, Marcel Dekker, 1999.
  34. Graham DW, Knapp CW, Van Vleck ES, Bloor K, Lane TB, Graham CE. Experimental demonstration of chaotic instability in biological nitrification. *ISME J* 2007; 1: 385-93.
  35. Gray NF, *Biology of Wastewater Treatment*. 2nd edition. London, UK, Imperial College Press, 2004.
  36. Heijstra BD, Pichler BF, Liang Q, Blaza RG, Turner SJ. Extracellular DNA and Type IV pili mediate surface attachment by *Acidovorax temperans*. *Antonie van Leeuwenhoek* 2009; 95: 343-9.
  37. Huber JA, Mark Welch DB, Morrison HG, Huse SM, Neal PR, Butterfield DA, Sogin ML. Microbial population structures in the deep marine biosphere. *Science* 2007; 318: 97-100.
  38. Jenkins D, Richard MG, Daigger GT, *Manual On the Causes and Control of Activated Sludge Bulking, Foaming, and Other Solids Separation Problems*, 3rd edition, Boca Raton, FL, CRC Press, 2004.
  39. Juretschko S, Timmermann G, Schmid M, Schleifer KH, Pommerening-Roser A, Koops HP, Wagner M. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 3042-51.
  40. Kaewpipat K, Grady CP, Jr. Microbial population dynamics in laboratory-scale activated sludge reactors. *Water Sci Technol* 2002; 46: 19-27.
  41. Keijsers B, Zaura E, Huse SM, Van Der Vossen J, Schuren FHJ, Montijn RC, Ten Cate JM, Crielaard W. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res* 2008; 87: 1016-20.
  42. Kimura K, Hara H, Watanabe Y. Elimination of selected pharmaceuticals by biosolids from municipal wastewater treatment plants: importance of modest pH change and degree of mineralization. *Water Sci Technol* 2010; 62: 1084-9.
  43. Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 5111-20.
  44. Li J. Effects of Fe(III) on floc characteristics of activated sludge. *J Chem Technol Biotechnol* 2005; 80: 313-9.
  45. Little AEF, Robinson CJ, Peterson SB, Raffa KF, Handelsman J. Rules of engagement: interspecies interactions that regulate microbial *Annu Rev Microbiol* 2008; 62: 375-401.
  46. Liu Y, Fang HHP. Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on flocculation, settling, and dewatering of activated sludge. *Crit Rev Environ Sci Technol* 2003; 33: 237-73.
  47. Lozada M, Basile L, Erijman L. Impact of non-ionic surfactant on the long-term development of lab-scale-activated sludge bacterial communities. *Res Microbiol* 2007; 158: 712-7.
  48. Lozada M, Figuerola EL, Itria RF, Erijman L. Replicability of dominant bacterial populations after long-term surfactant-enrichment in lab-scale activated sludge. *Environ Microbiol* 2006; 8: 625-38.
  49. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 2005; 437: 376-80.
  50. Martins AM, Pagilla K, Heijnen JJ, van Loosdrecht MC. Filamentous bulking sludge. A critical review. *Water Res* 2004; 38: 793-817.
  51. Martins AMP, Heijnen JJ, Loosdrecht MCM. Effect of dissolved oxygen concentration on sludge settleability. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003; 62: 586-93.
  52. McLellan SL, Huse SM, Mueller-Spitz SR, Andreishcheva EN, Sogin ML. Diversity and population structure of sewage-derived microorganisms in wastewater treatment plant influent. *Environ Microbiol* 2010; 12: 378-92.
  53. Moussa MS, Sumanasekera DU, Ibrahim SH, Lubberding HJ, Hooijmans CM, Gijzen HJ, van Loosdrecht MC. Long term effects of salt on activity, population structure and floc characteristics in enriched bacterial cultures of nitrifiers. *Water Res* 2006; 40: 1377-88.
  54. Muela A, M. O, Alonso ML, Pazos M, Arana I, Alonso RM, Jiménez RM, Garaizabal I, Maguregui IM, Isabel Barcina I. Microbiological parameters as an additional tool to improve wastewater treatment plant monitoring. *Ecol Indic* 2011; 11: 431-7.
  55. Nadarajah N, Grant Allen D, Fulthorpe RR. Effects of transient temperature conditions on the divergence of activated sludge bacterial community structure and function. *Water Res* 2007; 41: 2563-71.
  56. Navid A, Ghim C-M, Fenley AT, Yoon S, Lee S, Almaas E, *Systems Biology of Microbial Communities*, in *Methods in Molecular Biology, Systems Biology*, I.V. Maly, editor. New York, NY, Humana Press, 2009.
  57. Nichols D, Lewis K, Orjala J, Mo S, Ortenberg R, O'Connor P, Zhao C, Vouros P, Kaerberlein T, Epstein SS. Short peptide induces an "uncultivable" microorganism to grow *in vitro*. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 4889.
  58. Ofiteru ID, Lunn M, Curtis TP, Wells GF, Criddle CS, Francis CA, Sloan WT. Combined niche and neutral effects in a microbial wastewater treatment community. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 15345-50.
  59. Peressutti SR, Olivera NL, Babay PA, Costagliola M, Alvarez HM. Degradation of linear alkylbenzene sulfonate by a bacterial consortium isolated from the aquatic environment of Argentina. *J Appl Microbiol* 2008; 105: 476-84.
  60. Raszka A, Chorvatova M, Wanner J. The role and significance of extracellular polymers in activated sludge. Part I: Literature review *Acta Hydrochim Hydrobiol* 2006; 34: 411-24.
  61. Reddy K, Drysdale GD, Bux F. Evaluation of activated sludge treatment and settleability in remediation of edible oil effluent. *Water SA* 2004; 29: 245-50.
  62. Ritz K. The plate debate: cultivable communities have no utility in contemporary environmental microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* 2007; 60: 358-62.
  63. Roh SW, Kim KH, Nam YD, Chang HW, Park EJ, Bae JW. Investigation of archaeal and bacterial diversity in fermented seafood using barcoded pyrosequencing. *ISME J* 2009; 4: 1-16.
  64. Saikaly PE, Stroot PG, Oerther DB. Use of 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis to assess the impact of solids retention time on the bacterial diversity of activated sludge. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 5814-22.



65. Sanapareddy N, Hamp TJ, Gonzalez LC, Hilger HA, Fodor AA, Clinton SM. Molecular diversity of a North Carolina wastewater treatment plant as revealed by pyrosequencing. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 1688-96.
66. Schmid M, Thill A, Purkhold U, Walcher M, Bottero JY, Ginestet P, Nielsen PH, Wuertz S, Wagner M. Characterization of activated sludge flocs by confocal laser scanning microscopy and image analysis. *Water Res* 2003; 37: 2043-52.
67. Schneider DW. Process control as ecosystem management: using the history of sewage treatment plants to analyze ecosystem management practices. *Ecosystems* 2006; 9: 1156-69.
68. Schramm A, De Beer D, Wagner M, Amann R. Identification and activities in situ of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 3480-5.
69. Seviour RJ, Mino T, Onuki M. The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. *FEMS Microbiol Rev* 2003; 27: 99-127.
70. Sheng GP, Yu HQ, Li XY. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotech Adv* 2010; 28: 882-94.
71. Shukor MY, Gusmanizar N, Ramli J, Shamaan NA, McCormack WP, Syed MA. Isolation and characterization of an acrylamide-degrading Antarctic bacterium. *J Environ Biol* 2009; 30: 107-12.
72. Siezen RJ, Galardini M. Genomics of biological wastewater treatment. *Microb Biotechnol* 2008; 1: 333-40.
73. Siripong S, Rittmann BE. Diversity study of nitrifying bacteria in full-scale municipal wastewater treatment plants. *Water Res* 2007; 41: 1110-20.
74. Sliemers AO, Derwort N, Gomez JL, Strous M, Kuenen JG, Jetten MS. Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor. *Water Res* 2002; 36: 2475-82.
75. Sloan WT, Lunn M, Woodcock S, Head IM, Nee S, Curtis TP. Quantifying the roles of immigration and chance in shaping prokaryote community structure. *Environ Microbiol* 2006; 8: 732-40.
76. Sprott JC. Coexistence and chaos in complex ecologies. *Phys Lett A* 2005; 335: 207-12.
77. Stasinakis AS, Thomaidis NS, Mamais D, Papanikolaou EC, Tsakon A, Lekkas TD. Effects of chromium (VI) addition on the activated sludge process. *Water Res* 2003; 37: 2140-8.
78. Stevenson BS, Eichorst SA, Wertz JT, Schmidt TM, Breznak JA. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 4748-55.
79. Strous M, Pelletier E, Mangenot S, Rattei T, Lehner A, Taylor MW, Horn M, Daims H, Bartol-Mavel D, Wincker P, Barbe V, Fonknechten N, Vallenet D, Segurens B, Schenowitz-Truong C, Medigue C, Collingro A, Snel B, Dutilh BE, Op den Camp HJ, van der Drift C, Cirpus I, van de Pas-Schoonen KT, Harhangi HR, van Niftrik L, Schmid M, Keltjens J, van de Vossenberg J, Kartal B, Meier H, Frishman D, Huynen MA, Mewes HW, Weissenbach J, Jetten MS, Wagner M, Le Paslier D. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature* 2006; 440: 790-4.
80. Turner S, Brown C, Pichler F, Leahy S, Heijstra B, Galapaththige D. Development of *Acidovorax temperans* as a model organism to investigate cell-cell interactions in activated sludge, in *Genomes* 2008: Functional Genomics of Microorganisms, C. Buchreiser, editor. Institute Pasteur: Paris, France. 2008, p. 211-20.
81. van der Gast C, Ager D, Lilley AK. Temporal scaling of bacterial taxa is influenced by both stochastic and deterministic ecological factors. *Environ Microbiol* 2008; 10: 1411-8.
82. Vartoukian SR, Palmer RM, Wade WG. Strategies for culture of unculturable bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2010; 309: 1-7.
83. Vullo DL, Ceretti HM, Daniel MA, Ramírez SA, Zalts A. Cadmium, zinc and copper biosorption mediated by *Pseudomonas veronii* 2E. *Bioresour Technol* 2008; 99: 5574-81.
84. Vullo DL, Ceretti HM, Hughes EA, Ramírez S, Zalts A. Indigenous heavy metal multiresistant microbiota of Las Catonas stream. *Environ Monit Assess* 2005; 105: 81-97.
85. Wagner M, Loy A, Nogueira R, Purkhold U, Lee N, Daims H. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002; 81: 665-80.
86. Wang LK, Pereira NC, Hung Y-T. Biological Treatment Processes. *Handbook of Environmental Engineering*. New York, NY, Humana Press, 2009.
87. Water Environment Federation, *Clarifier Design*. 2nd edition Manual of Practice No. FD-8. Alexandria, VA, WEF Press, 2005.
88. Water Environment Federation, *Operation of Municipal Wastewater Treatment Plants. Manual of Practice* No. 11, edition. Alexandria, VA, WEF Press, 2008.
89. Wilen BM, Jin B, Lant P. Impacts of structural characteristics on activated sludge floc stability. *Water Res* 2003; 37: 3632-45.
90. Wilen BM, Jin B, Lant P. Relationship between flocculation of activated sludge and composition of extracellular polymeric substances. *Water Sci Technol* 2003; 47: 95-103.
91. Wilen BM, Jin B, Lant P. The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties. *Water Res* 2003; 37: 2127-39.
92. Wilen BM, Lumley D, Mattsson A, Mino T. Relationship between floc composition and flocculation and settling properties studied at a full scale activated sludge plant. *Water Res* 2008; 42: 4404-18.
93. Wilmes P, Andersson AF, Lefsrud MG, Wexler M, Shah M, Zhang B, Hettich RL, Bond PL, VerBerkmoes NC, Banfield JF. Community proteogenomics highlights microbial strain-variant protein expression within activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal. *ISME J* 2008; 2: 853-64.
94. Wilmes P, Wexler M, Bond PL. Metaproteomics provides functional insight into activated sludge wastewater treatment. *PLoS ONE* 2008; 3: e1778.
95. Xia S, Duan L, Song Y, Li J, Piceno YM, Andersen GL, Alvarez-Cohen L, Moreno-Andrade I, Huang CL, Hermanowicz SW. Bacterial community structure in geographically distributed biological wastewater treatment reactors. *Environ Sci Technol* 2010; 44: 7391-6.
96. Yunes F, Baldini MD, Gómez MA. Microbial enumeration of different functional groups and bacterial behavior in acid basic conditions of a biotoxic landfill leachate of Bahía Blanca, Argentina. *Water Environ Res* 2009; 81: 546-50.
97. Zengler K. Central role of the cell in microbial ecology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009; 73: 712-29.
98. Zita A, Hermansson M. Effects of ionic strength on bacterial adhesion and stability of flocs in a wastewater activated sludge system. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 3041-8.