

**CONTROL DE ORGANISMOS FILAMENTOSOS MEDIANTE SELECCIÓN CINÉTICA Y METABÓLICA
EN SISTEMAS DE LODOS ACTIVADOS**

Walter Di Marzio, María Elena Sáenz, María del Carmen Tortorelli y José Luis Alberdi

PRIET - DPTO. CS. BS. - UNLU C.C. 221 Luján (B) 6700

Fax: 02323-425795

E-mail: labetox@mail.unlu.edu .ar / wdimarzio@impsat1.com.ar

Palabras clave: bulking, lodos activados, bacterias filamentosas

Resumen

Se analizaron muestras de lodos activados provenientes de sistemas de depuración de dos industrias químicas. Se realizó la diagnosis de las mismas determinando su patología. En los dos casos las muestras presentaron Bulking. Se determinaron las especies de bacterias filamentosas responsables del bulking. En la industria 1 se identificó *Thiothrix l* y en la industria 2 el *Tipo 021N*. Ambas bacterias fueron eliminadas sin aplicar métodos drásticos de control mediante el empleo de agentes químicos como el cloro o el peróxido de hidrógeno. A partir del conocimiento biológico de cada especie se desarrollaron distintos selectores y controles de proceso que tendieron a eliminar el problema del bulking de un modo no destructivo para las bacterias formadoras de flóculos. En las dos plantas depuradoras se obtuvieron resultados positivos. *Thiothrix* sp fue eliminada mediante la combinación de selectores aeróbicos-anóxicos y el *Tipo 021N* con selectores anóxicos.

INTRODUCCIÓN

El tratamiento biológico de los efluentes domésticos e industriales consiste, esencialmente, en la acción combinada de las poblaciones de bacterias que utilizan las sustancias presentes en esos efluentes para cubrir sus necesidades metabólicas. De esta manera dan origen a nuevos microorganismos o biomasa que constituye el fango o lodo producido por el sistema; y productos del catabolismo, principalmente H_2O , CO_2 , NO_3^- , $\text{SO}_4^{=}$ o CH_4 , en función de si la biodegradación ocurre en presencia o no de oxígeno. La acción de biodegradación está realizada principalmente por las bacterias, las cuales en base a su naturaleza procariótica presentan una gran versatilidad en la utilización de una amplia gama de sustratos y reducidos tiempos de duplicación poblacional. Los grupos de bacterias presentes en un sistema aeróbico y otro anaeróbico se diferencian claramente. En el primer caso, actúan bacterias aeróbicas y anaeróbicas facultativas; en el segundo anaeróbicas facultativas y anaeróbicas estrictas (como las que forman metano). Por otro lado, las bacterias que intervienen en la remoción de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo, funcionan como bacterias aeróbicas y anaeróbicas o anóxicas facultativas (las bacterias responsables de la desnitrificación son un ejemplo de estas últimas). El conocimiento de los diferentes tipos de bacterias y como así también de sus metabolismos es una de las bases para la instalación de selectores y del sistema llamado *SBR* (Sequential Batch Reactor).

La observación microscópica de una lodo activado que no presenta ninguna patología relacionada con su sedimentabilidad, aparece como una masa gelatinosa compuesta de numerosas bacterias reunidas en agrupados de dimensiones variables, entre 50 a 1000 μm , denominada flóculos. La estructura del flóculo puede presentar, por otro lado, modificaciones que alteran su sedimentabilidad y conducir, por lo tanto, a la aparición de problemas en la fase de separación de la parte líquida y sólida en el sedimentador secundario. Se analizaron muestras de lodos activados provenientes de dos industrias químicas las cuales presentaban problemas de sedimentabilidad en el sedimentador secundario.

MATERIALES Y METODOS

Las muestras fueron analizadas dentro de las 24 horas y hasta el momento de su observación fueron mantenidas a 4°C . La observación microscópica se realizó con un microscopio Nikon Eclipse 600 provisto de contraste de fase y epifluorescencia. La primera observación se realizó en contraste de fase con una magnificación de 1000x. Cuando fue necesario se realizaron tinciones y tests específicos a saber: tinciones

Gram, Neisser, Cristal Violeta y los tests del azufre, y de la tinta china. Los polihidroxicarbonos se determinaron mediante epifluorescencia con el empleo de filtros y fluorógenos específicos.

Los parámetros determinados para realizar la diagnosis patológica de los barros fueron:

Demanda bioquímica de oxígeno ($DBO_{C,5,20}$) mediante el método respirométrico de Warburg.

Demanda química de oxígeno (DQO): se determinó a través del método espectrofotométrico a partir de la digestión de la muestra en un reactor de Hach y mediante del empleo del espectrofotómetro Hach DR3000 a 620nm.

Fósforo soluble, nitrógeno como amonio, nitatos, nitritos, nitrógeno total y pH: a partir de los protocolos presentados en el Standard Methods (APHA, 1993).

Sólidos en suspensión totales (SS) y volátiles (SSV): siguiendo las técnicas tradicionales de filtrado y secado en horno y mufla se determinaron respectivamente los SS o MLSS (mixed liquor suspended solids) y SSV o MLVSS (mixed liquor volatile suspended solids) de acuerdo a Neketin (1985). Según Vismara *et al* (1991) se determinaron los siguientes índices:

Volumen del fango VF: dicho parámetro representa el volumen en mililitros o cm^3 ocupado por una muestra de lodo activado sometido a sedimentación estática por 30 minutos en un cono de Imhoff o probeta de 1L.

Índice volumétrico del lodo o SVI o Índice de Mohlman: este parámetro indica el volumen ocupado por un gramo de lodo después de sedimentación estática en cono de Imhoff o probeta de 1L.

SVI diluido según la siguiente ecuación: $SVI_d = \frac{Vf}{SS} * 2^n$

Donde Vf es el volumen del fango menor a 200 mL a la dilución n , n es el número de diluciones para que Vf sea menor a 200 mL.

Índice de Biofloculación (IB): $\frac{SS_s}{SS}$ donde SS_s son los sólidos en suspensión en el sobrenadante después de 120 minutos de sedimentación estática. Dicha variable estima la capacidad del lodo de producir un efluente final límpido es decir con una baja concentración de sólidos en suspensión. Un valor ideal oscila entre 2.5 y 5.

Índice de flotación (IF): $\frac{Tf}{120}$ donde Tf es el tiempo en el cual se registra flotación del barro sometido a sedimentación. Un valor de 1 o mayor se considera óptimo.

Mediante el empleo de un microscopio de contraste de fases (X1000) se realizó el análisis de la estructura microscópica del fango caracterizandolo cuali y cuantitativamente. Siguiendo el método de Madoni e Davoli (1992) se determinó el índice de bacterias filamentosas (F) expresado como número de filamentos por unidad de volumen (N^o F/ μ L) y por peso de MLSS (N^o F/ μ g). Este método consiste en tomar 50 μ L de muestra del lodo activado bajo estudio y realizar el conteo de las intersecciones de los filamentos bacterianos a través de una transecta. Esta se encuentra dibujada en el ocular del microscopio o directamente sobre el cubreobjeto; teniendo como base la superficie del cubreobjeto utilizado (por lo general 24 x 32 mm) los conteos se realizan a lo largo de todo el campo de observación. Este procedimiento se repite en n campos y se obtiene un valor medio de las intersecciones por campo. Así se tiene que:

- Filamentos/ μ L (F \bar{v}) = $\frac{Ni}{50mL} \times Nt$ donde Ni es igual al número medio de intersecciones por campo y Nt es el número total de campos posibles en la superficie del cubreobjeto utilizado.

- $$\text{Filamentos}/\mu\text{g} = \frac{F_v \times 10^6 (\text{mL} / L)}{MLSS (\text{g} / L) \times 10^6 (\text{mg} / \text{g})}$$

Se determinó el índice de abundancia relativa de organismos filamentosos según Richard (1989). Dicho índice clasifica el grado de *bulking* de la siguiente manera:

Valor 0 = no existen filamentos en los flóculos

Valor 1 = filamentos ocasionales

Valor 2 = frecuentes pero no en todos los flóculos

Valor 3 = filamentos en todos los flóculos en número de 1 a 5

Valor 4 = 5 a 20 filamentos por flóculo

Valor 5 = más de 20 filamentos por flóculo

Valor 6 = más filamentos que flóculos inclusive creciendo solos en el líquido circundante

Se analizó la estructura de los flóculos mediante el análisis de imágenes utilizando *Image-Pro - Media Cybernetics*. Se obtuvieron relaciones de densidad óptica para los flóculos en distintas condiciones de SVI.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 1 se presentan los valores de los parámetros determinados. A partir de los mismos se concluyó que las dos muestras analizadas presentaban la patología de *Bulking*. En la escala relativa de Richard las mismas tuvieron valores de 6 y 5, para la primera y segunda industria, respectivamente. De la Tabla 1 puede evidenciarse además, la elevada concentración de sulfuros en el efluente de entrada de la primera industria. Ambas industrias se encontraban trabajando con cargas de fango (relación F/M) relativamente bajas y por consiguiente edades de fango, relativamente altas, superiores a los 5 - 8 días. La segunda industria presentó un desbalance en la relación teórica recomendada de DBO:N:P, evidenciando un defecto de fósforo. Del análisis microbiológico efectuado, se determinaron como especies dominantes, responsables de los problemas de sedimentabilidad, las siguientes bacterias: *Thiothrix Tipo 1* para la industria 1, y el Tipo 021N para la industria 2.

Las características morfológicas y biológicas de estas bacterias se presentan en la Tabla 2. *Thiothrix Tipo 1* está asociada a problemas de bulking en sistemas de lodos activados, debido a las principales causas: presencia de sulfuros, deficiencia de nutrientes, principalmente nitrógeno, y condiciones de elevada carga orgánica vinculada a la cantidad de ácidos orgánicos de bajo peso molecular. Posee una capacidad adaptativa al uso metabólico de diferentes sustratos. Puede crecer a partir de una fuente carbonosa (heterotofia), utilizar los sulfuros para la síntesis de materia orgánica (autotrofia) o ambas (mixotrofia) (Tandoi *et al* 1994). La capacidad de crecimiento autotrófico representa una ventaja para esta especie la cual compete con las bacterias formadoras de flóculos, cuando existen fuentes de sulfuros en el efluente a depurar. Esto último y la capacidad de almacenar nutrientes durante el metabolismo heterotrófico, hacen que muchas veces el estado patológico del sistema se vuelva crónico: bulking filamentoso crónico. Es una bacteria que puede crecer en rosetas desde el centro de los flóculos y presentar evidentes gonidios.

El *Tipo 021N* es una especie muy frecuentemente reportada como principal responsable en situaciones de bulking agudo y crónico. Se extiende desde la superficie de los flóculos pudiendo formar puentes entre ellos.

Tabla 1. Parámetros determinados para realizar la diagnosis patológica de las muestras de lodos activados evaluadas. Todos los datos están expresados en mg/L.

Parámetro	Industria 1	Industria 2
SVI cc/g	500	390
SVId cc/g	240	220
IB	10	8
IF	1	1
Escala de Richard	6	5
Filamentos/ μ g	46.12	30.33
Filamentos/ μ L (F v)	157.5	102.34
PO ₄ ⁼ salida	0.5	0.1
NO ₃ ⁻ salida	2	1
NH ₄ ⁺ salida	20	16
PH salida	8.12	7.98
DBO salida	70	60
DQO salida	340	310
Carga fango Kg DBO/Kg SSV d	0.2	0.25
S ⁼ entrada	120	30
DBO:N:P pileta	130:6:1	120:6:0.5

Tabla 2. Características morfológicas y tinciones de las bacterias filamentosas encontradas.

Organsimo	Gram	Neisser	S test	Inclusiones	Largo tricoma μ m	Forma del tricoma	septos	vaina	Tamaño μ m y forma celular
<i>Thiothrix l</i>	-	-	+	PHB	> 500	Rectos	+	+	2 x 4 rectángulos
<i>Tipo 021N</i>	-	-	V	PHB	50 -1000	Rectos	+	-	1.5 x 2 barril discos rectángulos

V: variable, PHB: polihidróxibutiratos, +: positivo, -: negativo

Posee un filamento de longitud variable desde 50 a 1000 μ m , recto o ligeramente curvo. Su aparición está asociada a efluentes con carencia de nutrientes, relaciones de carga de fango bajas. Posee una elevada capacidad para absorber nutrientes, especialmente nitrógeno en bajas concentraciones. Está citada en una gran variedad de industrias: alimenticias, petroquímicas, papeleras, cerveceras, entre otras.

Desde el punto de vista cinético ambas bacterias son Ks estrategias, es decir poseen una mayor capacidad de crecimiento o una mayor tasa de crecimiento (μ) a bajas concentraciones de sustratos. A diferencia de las bacterias floculantes que son $\mu_{m\acute{a}xima}$ estrategias, es decir poseen una mayor tasa de crecimiento pero necesitan mayores concentraciones de sustrato (ver Figura 1).

En diferentes situaciones ambientales ambos grupos de bacterias pueden almacenar sustancias de reserva. Por ejemplo en presencia de elevadas concentraciones de sustrato y ausencia de oxígeno, al no poder utilizarlo lo reservan rápidamente como inclusiones celulares. Una forma de reservar la fuente de carbono es como Polihidróxialcanos, generalmente Polihidróxibutirato (PHB). En la Figura 2 se resumen las principales reacciones que ocurren en cada situación ambiental.

Figura 1. Curvas de crecimiento para bacterias floculantes y filamentosas .

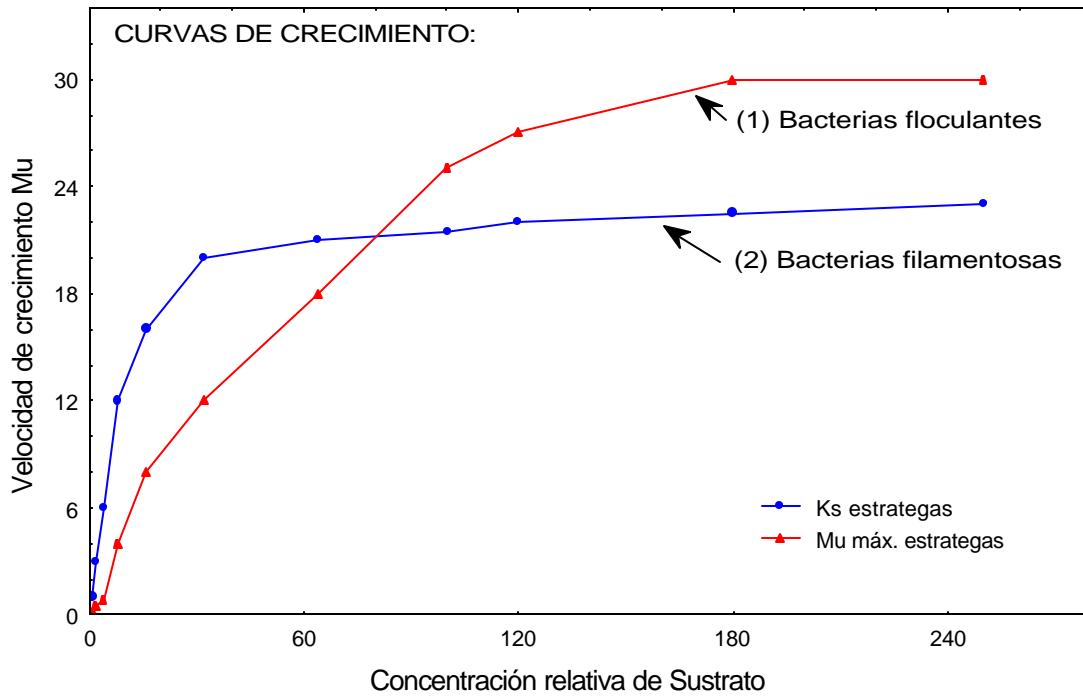
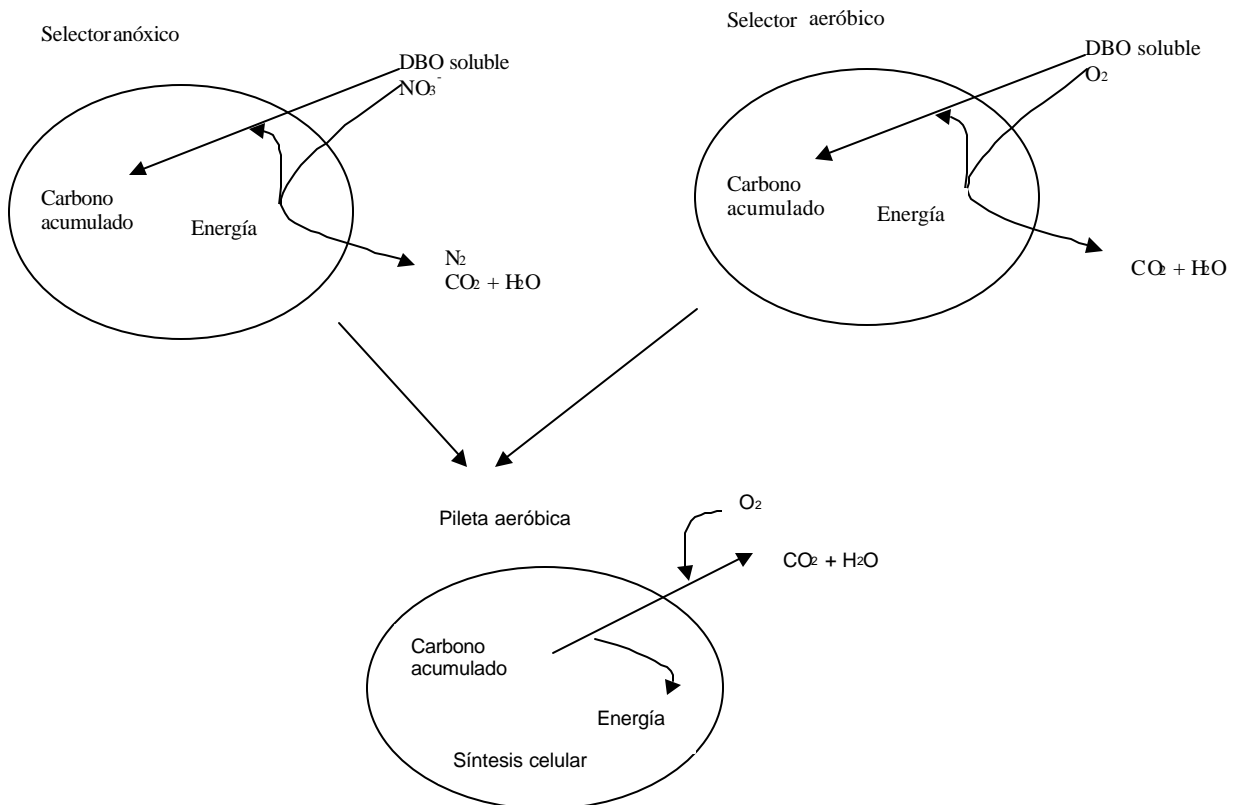


Figura 2. Esquema de las reacciones metabólicas que pueden ocurrir en los selectores utilizados en relación a la acumulación de sustancias de reserva.



En condiciones de crecimiento no balanceado, con fases de absorción del sustrato y posterior utilización, las bacterias formadoras de flóculos resultan más eficientes respecto de las bacterias filamentosas *Thiothrix Tipo 1* y el *Tipo 021N*. Selectores del tipo aeróbico-anóxicos son los más eficientes para el control de este tipo de microorganismos.

Para el caso de la eliminación de *Thiothrix* sp se tuvieron en cuenta los siguientes puntos:

- ✓ Disminución de la concentración de sulfuros en el efluente de entrada
- ✓ Aumento de la relación F/M
- ✓ Disminución de los gránulos de azufre presente en los filamentos cambio hacia metabolismo heterotrófico
- ✓ En el selector anóxico aparición de PHB en flóculos y reducción del número de filamentos por floc y SVI
- ✓ Los resultados se resumen en la Figura 3

Para el caso de la bacteria *Tipo 021N* se realizaron las siguientes modificaciones:

- ✓ Agregado de fósforo
- ✓ Aumento de la relación F/M
- ✓ Aumento de la concentración de sustrato con descargas cíclicas
- ✓ Aparición después del selector anóxico de PHB en bacterias floculantes y reducción del SVI
- ✓ Ver Figura 4

En la Figura 5 se indican los histogramas de densidad óptica obtenidos para un pool de muestras provenientes de las plantas depuradoras bajo estudio antes y después de los problemas de bulking evaluados. Se observó una relación, vinculada con la estructura de los flóculos, en función de su estado patológico. Fangos con bulking resultaron tener menor densidad óptica y menor abundancia óptica por pixel estudiado. Podríamos especular y pensar que los flóculos con bulking resultaron ser más livianos. La técnica de análisis de imágenes para evaluar el estado de los flóculos resulta una herramienta interesante a profundizar relacionándola de un modo sistemático a parámetros tradicionales como el SVI.

Figura 3

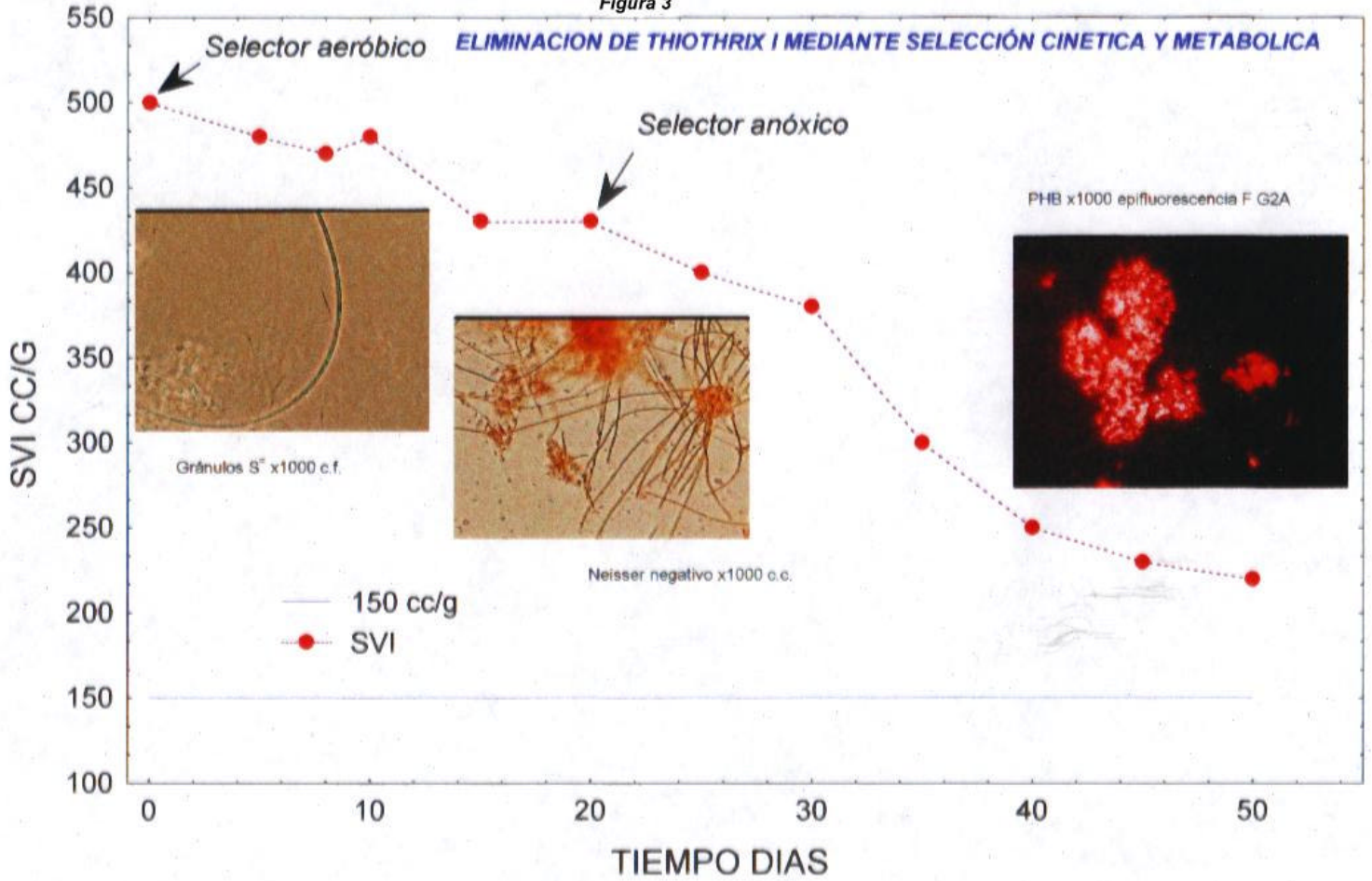


Figura 4. Eliminación del *Tipo 021N*. Imágenes x1000 observadas mediante Epifluorescencia y contraste de fase, filtro F G2A Nikon.

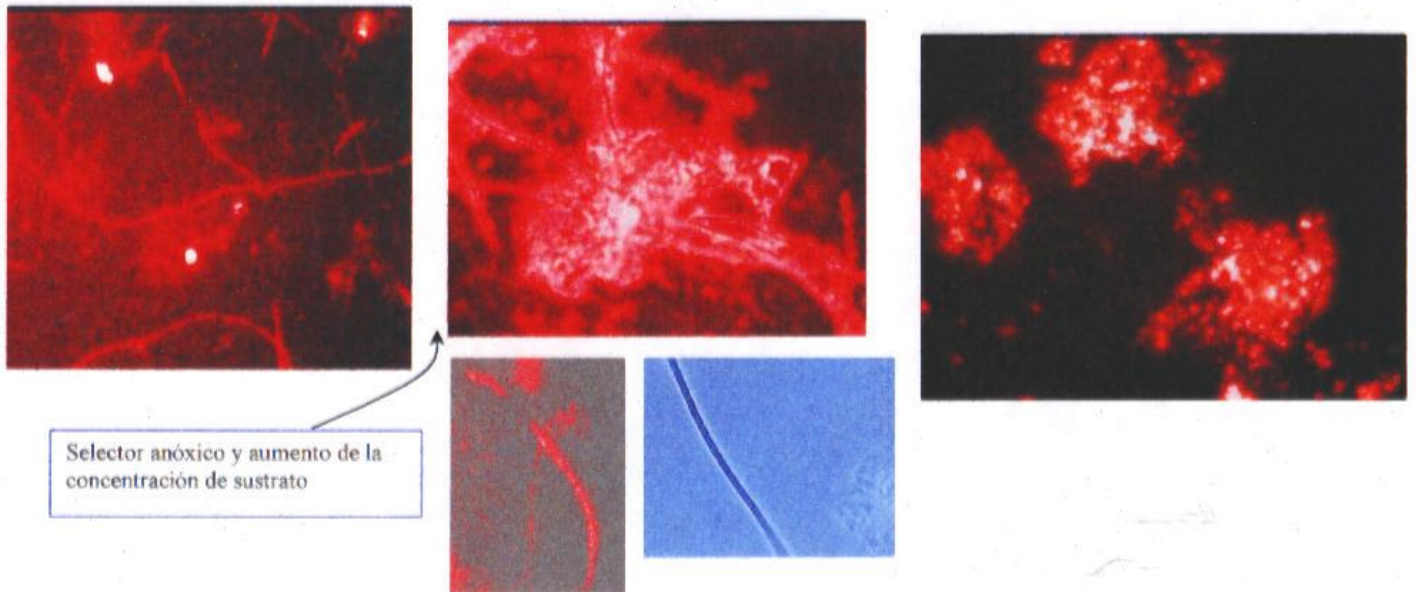
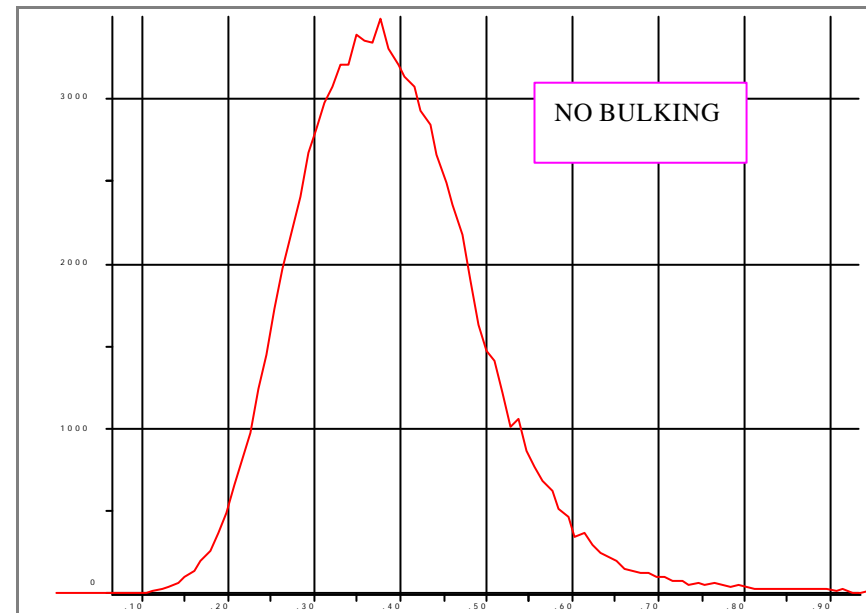
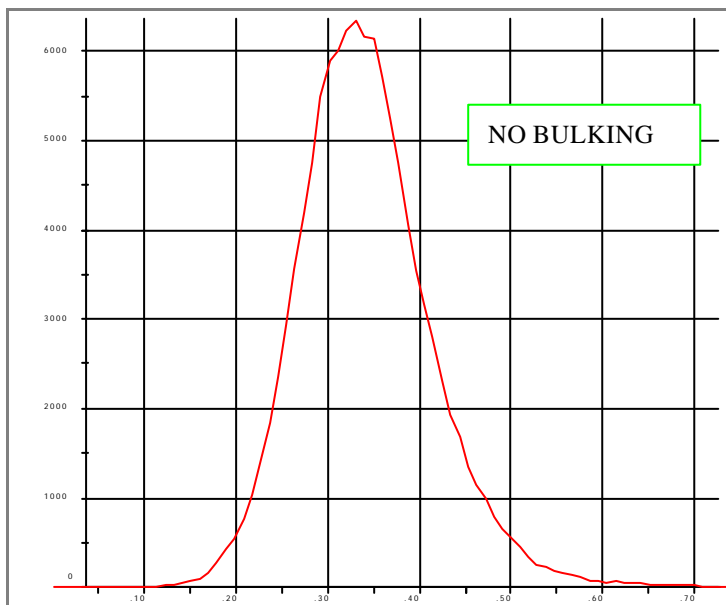
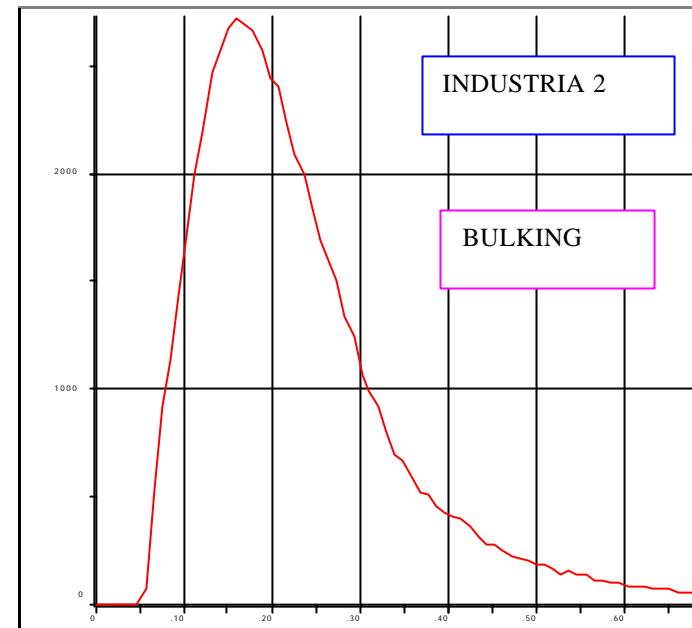
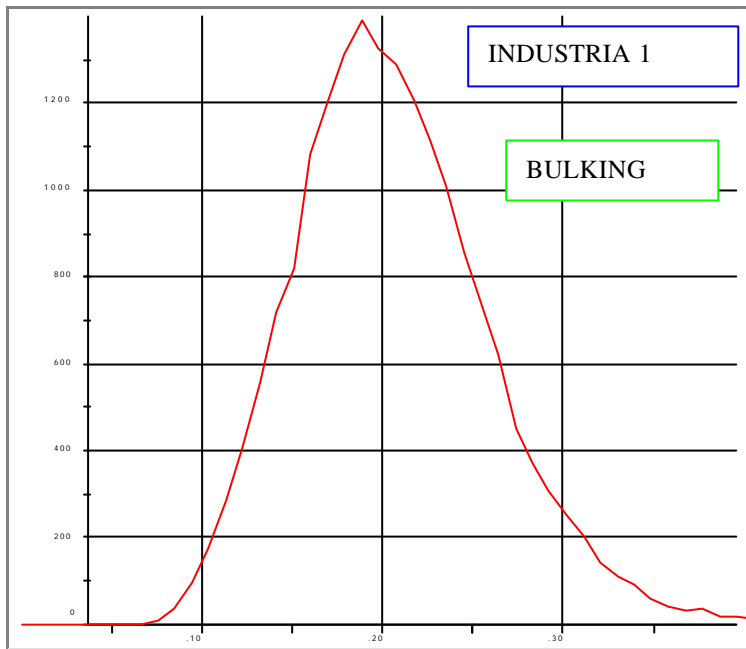


Figura 5. DENSIDAD OPTICA DE FLOCULOS X1000 CF IMAGE PRO



Bibliografía

AGAC, 1992. I principali microrganismi filamentosi del fango attivo: caratteristiche ecologiche e metodi di identificazione. Azienda Gas Agua Consorziale - Reggio Emilia, N° 5, 102 p..

Alberdi JL, Sáenz ME, Tortorelli MC y Di Marzio W, 1999. Monitoreo de un programa de reducción de toxicidad de un efluente proveniente de la industria química. Rev. Ingeniería Sanitaria y Ambiental - AIDIS, N° 42: 32-35.

APHA, AWWA and WEF, 1992. Standard Methods for the examination of water and wastewater. APHA, AWWA and WEF eds, 18th edition Washington - USA, 1042 pag.

Di Marzio WD, Alberdi JL, Tortorelli MC y Sáenz ME, 1999. Indicadores microbiológicos del funcionamiento de sistemas industriales de depuración por lodos activados de la provincia de Buenos Aires. Rev. Ingeniería Sanitaria y Ambiental – AIDIS, Número 45: 94 - 100.

Di Marzio WD, Alberdi JL, Tortorelli MC, Sáenz ME, 1996. Aplicación de la tasa de respiración para evaluar la degradabilidad del herbicida Acetoclor en un sistema de lodos activados. Rev. Ingeniería Sanitaria y Ambiental - AIDIS, N° 29: 48-50.

Di Marzio WD, Sáenz ME, Tortorelli MC, Alberdi JL, 1999. Bulking Filamentoso en seis sistemas depurativos por lodos activados de la provincia de Buenos Aires. Rev. Ingeniería Sanitaria y Ambiental – AIDIS. Número 46: 82- 86.

Di Marzio WD, Tortorelli MC, Sáenz ME y Alberdi JL, 1997. Bulking filamentoso en un sistema de lodos activados de una curtiembre: diagnosis y caracterización. Rev. Ingeniería Sanitaria y Ambiental - AIDIS, N° 33: 38-42.

Di Marzio, WD; Sáenz ME; Alberdi JL and Tortorelli, MC, 1999. Assessment of the Toxicity of Stabilized Sludges using *Hyalella curvispina* (Amphipod) Bioassays. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, Vol.63 (5): 654-659.

Sáenz ME, Tortorelli MC, Alberdi JL y Di Marzio W, 1998. Evaluación de la toxicidad de efluentes industriales mediante la utilización de ensayos ecotoxicológicos: industrias químicas. Rev. Ingeniería Sanitaria y Ambiental - AIDIS, N° 40: 49-53.

Tandoi V, Caravaglio N, Di Dio Balsamo D, Majone M and Tomei MC, 1994. Isolation and Physiological Characterization of *Thiothrix* sp. Wat. Sci. Tech. 29 (7):261-269.