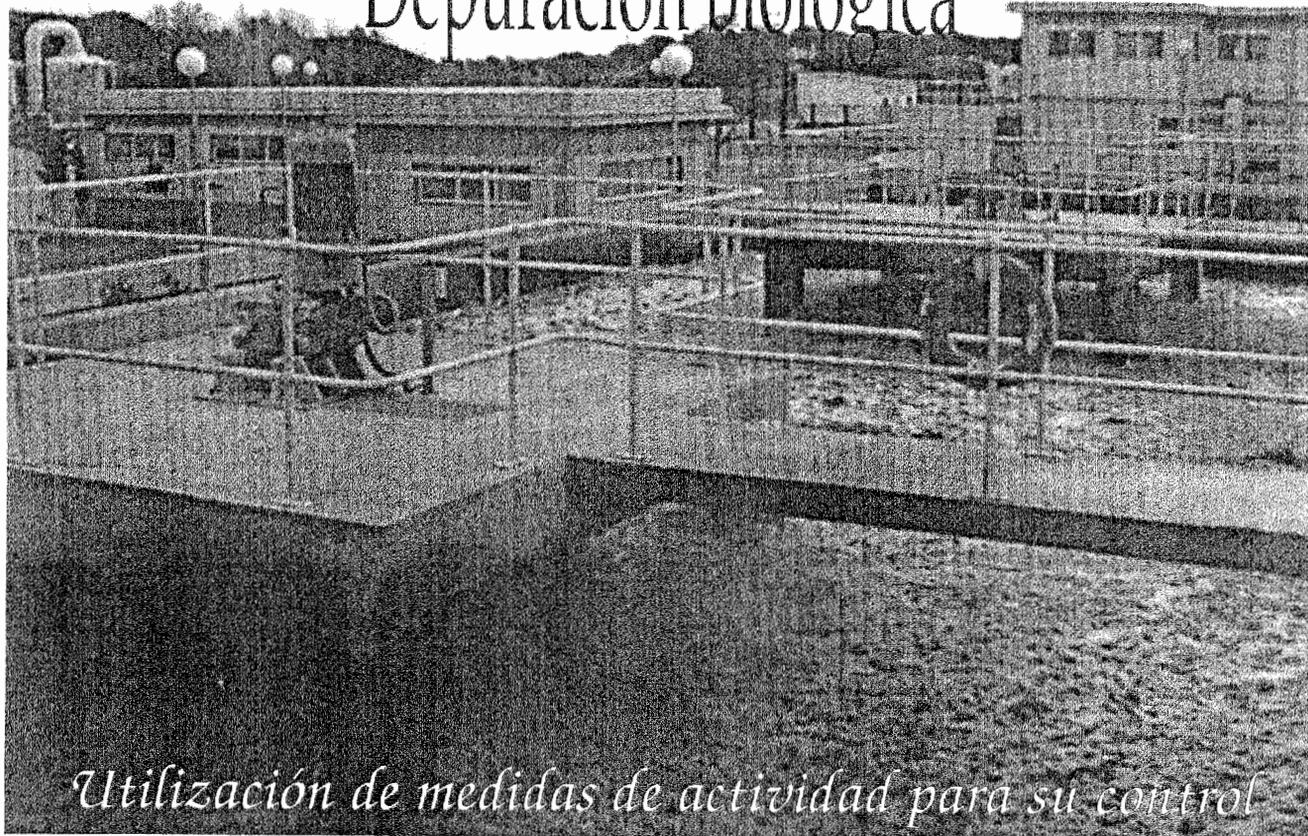


# Depuración biológica



*Utilización de medidas de actividad para su control*

## Introducción

Las medidas de actividad se han ido desarrollando a lo largo de las tres últimas décadas, pero ha sido en esta última cuando han presentado unos avances más destacados. En esta línea se ha realizado el presente artículo, con el objetivo de aplicar estas técnicas al control y evaluación de los procesos en los distintos aspectos de las tecnologías medioambientales, tal es el caso de su aplicación en la determinación del grado de estabilidad de los lodos digeridos aeróbicamente.

La contaminación de los cauces receptores por las aguas residuales urbanas constituyen uno de los problemas más importantes de nuestros días y el tratamiento y depuración de estas aguas es uno de los principales retos a los que se enfrenta la sociedad actual.

Se pone así de manifiesto la necesidad de construcción de Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs), las cuales, y en el caso concreto de España, ha recibido un importante impulso en los últi-

mos años como consecuencia de las obligaciones impuestas por la directiva europea 91/271 sobre el tratamiento de las aguas residuales.

Los tratamientos a los que se ven sometidas las aguas en estas instalaciones están constituidos por una serie de procesos físicos, químicos y biológicos, cuya secuencia va a venir determinada por el tipo de agua a tratar y el grado de depuración necesario.

Dentro del esquema básico de una estación depuradora convencional de aguas residuales se pueden distinguir: pretratamiento, tra-

tamiento primario, tratamiento secundario y tratamiento terciario, siendo el tratamiento secundario el corazón del sistema de depuración.

Los tratamientos secundarios, pueden ser bien procesos físico-químicos o biológicos, siendo estos últimos los más utilizados. En los tratamientos biológicos utilizados para la eliminación de la materia orgánica que tanto en forma soluble como coloidal, se encuentran presentes en las aguas residuales.

En estos procesos, los microorganismos son los componentes más importantes de los mismos,

**M.ª Dolores COELLO OVIEDO**

*Doctor Ingeniero Químico*

*Profesora Asociada*

**Diego SALES MÁRQUEZ**

*Doctor en Ciencias Químicas*

*Catedrático de Tecnologías del Medio Ambiente*

*Centro Andaluz Superior de Estudios Marinos*

**José M.ª QUIROGA ALONSO**

*Doctor en Ciencias Químicas*

*Profesor Titular de Universidad*

*Centro Andaluz Superior de Estudios Marinos*

*Facultad de Ciencias del Mar*

*UNIVERSIDAD DE CÁDIZ*

*Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnología del Medio Ambiente*

por lo que conocer su estado fisiológico y su actividad resulta fundamental para poder predecir el rendimiento del sistema.

En la actualidad, en las unidades biológicas de las depuradoras de aguas residuales no se suele llevar a cabo un control sistemático de la actividad de los microorganismos presentes en el sistema, y en las que se hace, el control se realiza a través de métodos poco contrastados que no informan directamente sobre el estado de la actividad microbiana.

La medida de la actividad microbiana puede resultar un instrumento adecuado para el control de la unidad biológica de las EDARs, lo que va a permitir mejorar las condiciones de operación de la planta lo que conlleva importantes ventajas medioambientales, pues se consigue una mayor eficacia depurativa y prevención de episodios de inestabilidad de la unidad.

En resumen, el conocimiento de el estado de actividad microbiano del sistema biológico nos van a permitir:

- \* prever el comportamiento del sistema, lo que posibilita actuar sobre el mismos en condiciones adversas,
- \* obtener la evolución de la biomasa microbiana activa a lo largo del proceso, y
- \* evidenciar la presencia de alguna sustancia tóxica o inhibidora para los microorganismos responsables de la depuración en los procesos biológicos.

De todas las medidas de actividad descritas en la bibliografía (Winding, *et al.*, 1994; López *et al.*, 1986; Nybrone *et al.*, 1992), se han seleccionado las siguientes:

- \* actividad esterasa,
- \* actividad deshidrogenasa,
- \* tasa de respiración, y
- \* tasa específica de respiración.

## Descripción de las medidas de actividad

### Medidas enzimáticas

#### Actividad esterasa

La medida de la actividad esterasa es una medida de actividad enzimática, la cual se cuantifica con la hidrólisis de una molécula sintética llamada FDA (diacetato de fluoresceína). La hidrólisis de esta molécula se ha aplicado en estudios ambientales para la cuantificación de microorganismos eucariotas y procariotas en sedimentos, y también en estudios de actividad metabólica microbiana.

Este método se basa en la capacidad de las enzimas (por ejemplo esterases, lipasas, proteasas) sintetizadas por bacterias u hongos, para romper la molécula de FDA y producir un compuesto fluorescente (fluoresceína), el cual se puede medir espectrofotométricamente o ser detectado en un microscopio de epifluorescencia.

El FDA tiñe específicamente a las células que poseen actividad esterasa y membranas intactas, aunque a veces se puede unir a sustan-

cias inorgánicas u orgánicas, lo que llevaría a resultados de actividad erróneos. En las células muertas no se produce acumulación, ya que la membrana puede estar perforada.

#### Actividad deshidrogenasa

Las enzimas deshidrogenasas son aquellas que separan el hidrógeno del sustrato. Son, por tanto, enzimas oxidantes que participan en el transporte de electrones, desde un sustrato orgánico hasta el sustrato aceptor del electrón final. En el metabolismo aerobio, el sustrato aceptor es el oxígeno, de esta forma, la velocidad de consumo de oxígeno refleja sobretodo la actividad deshidrogenasa (DHA).

Para la determinación de la actividad deshidrogenasa se han utilizado diferentes fluorocromos oxidoreductores que compiten con el oxígeno en el sistema de transporte de electrones (ETS), entre los que están el azul de metileno (Jorgensen, 1984) y las sales de tetrazolium. Estos últimos compuestos han sido los más utilizados en los últimos años.

Las sales de tetrazolium se presentan en su estado oxidado como compuestos solubles en agua y de color amarillo o incoloro, mientras que bajo condiciones reductoras se convierte en un compuesto insoluble en agua e intensamente coloreado. Estos compuestos formados son los llamados sales de formazán. Las dos sales de tetrazolium que se han utilizados más usualmente han sido:

- \* TTC (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolium) e
- \* INT (cloruro de 2(p-nitrofenil)-5-feniltetrazolium).

El compuesto INT ha sido introducido como sustituto del TTC. La principal ventaja que posee este compuesto frente al TTC es su menor potencial redox (+ 90 mV).

Las ventajas que presenta el INT frente al TTC (*figura 1*) son las siguientes:

- \* favorable competencia frente al oxígeno en la respiración celular, permitiendo el ensayo en condiciones aerobias,
- \* utilizable en una amplio margen de temperaturas, y

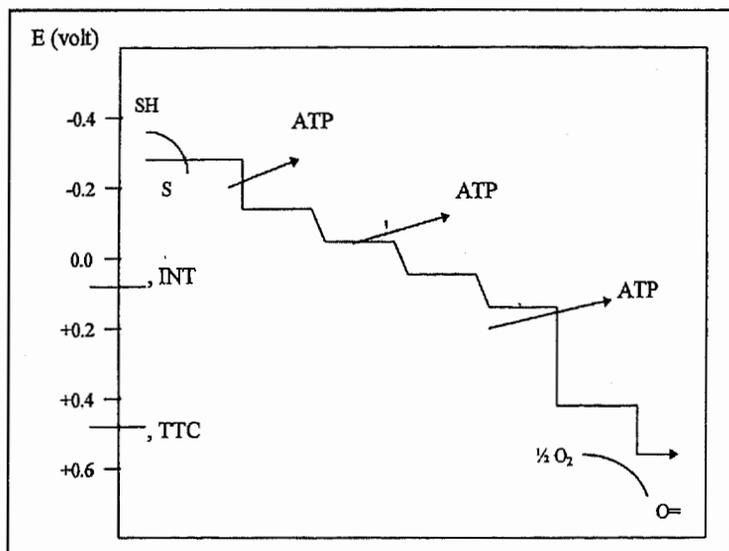


Figura 1. Esquema de potenciales redox [E, en voltios] en el ETS [Bécares y Soto, 1992].

\* transformación en una forma reducida, coloreada, insoluble en agua y extraíble con disolventes orgánicos, la sal de formazán, que permite su detección en el citoplasma.

La forma reducida de INT-formazán, precipita en el interior de las células y determinación de la actividad deshidrogenasa se realiza a través de una medida espectrofotométrica. Como hemos dicho anteriormente los cristales de formazán precipitan en el interior de las células, el cual podría ser detectadas por microscopía, pero desafortunadamente los depósitos de formazán que se forman son muy pequeños y resulta difícil distinguirlos, especialmente en muestras naturales. Es por esto, por lo que se ha introducido un nuevo fluorocromo, concretamente es la sal de formazán llamada "cloruro de 5-cyano-2,3-ditoliltetrazolium" (CTC), como método para la detección de células viables. El CTC se reduce a un compuesto fluorescente, formazán insoluble, el cual se acumula en las células que respiran. La fluorescencia facilita la detección y se puede determinar simultáneamente el número de células activas y el número total de células utilizando conjuntamente el fluorocromo DAPI, el cual se combina con el DNA de las células

El inconveniente que posee esta técnica es su alto coste, pero entre las ventajas principales que presenta tenemos, rapidez en la respuesta y un estudio cuantitativo

y cualitativo de la población presente en el sistema:

Gracias a los cortos periodos de incubación (1-3 horas) y la detección por microscopía de epifluorescencia, los ensayos de reducción de CTC otorgan rápidos resultados de viabilidad celular, la información cuantitativa de la población activa existente en el reactor.

### Ensayos Cinéticos

La base de los métodos cinéticos es la medida del consumo de sustrato o de la formación de un producto, en estudios en discontinuo, que tengan una relación determinada en su producción o consumo, con el número de microorganismos viables, consumidores o productores, en el medio objeto de estudio.

La actividad de los microorganismos es medida a través de la velocidad con la que un cultivo consume un sustrato o genera un producto, y esta velocidad está determinada más por el estado metabólico del microorganismo que por el número de individuos.

La tasa de respiración se define como la velocidad (OUR: *Oxygen Uptake Rate*) con la que los microorganismos de un fango activo utilizan el oxígeno ( $\text{mgO}_2/\text{L/h}$ ), para su respiración endógena, su respiración exógena, para la oxidación del sustrato orgánico y para el proceso de nitrificación (si lo hubiese). Las unidades normalizadas de la tasa de respiración son  $\text{mgO}_2/\text{L/h}$ , figura 2.

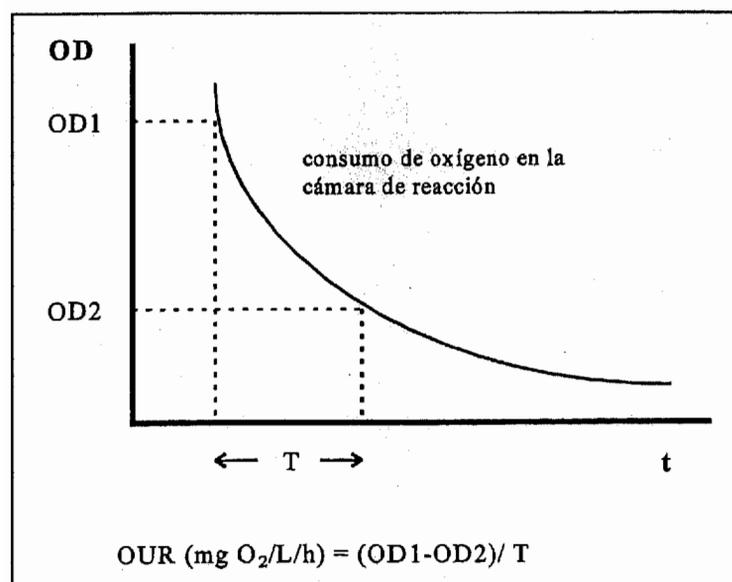


Figura 2. Tasa de respiración.

Siendo más utilizada el valor de Tasa específica Respiración específica que se define como la velocidad de consumo de oxígeno por unidad de biomasa y por unidad de tiempo.

Durante un largo tiempo, la respirometría ha sido reconocida como una base muy valiosa para el control del proceso de lodos activos. Esto se debe a que los procesos de respiración están directamente relacionados con dos procesos bioquímicos importantes que deben ser controlados en las plantas de aguas residuales: el crecimiento de biomasa y el consumo de sustrato.

La velocidad a la cual el oxígeno es consumido (tasa de respiración) puede ser seguida con relativa facilidad, mediante la medida del oxígeno disuelto o como presión parcial de oxígeno. Por esta razón, la respirometría se presenta como una herramienta alternativa potente para valorar la situación de un sistema de lodos activos.

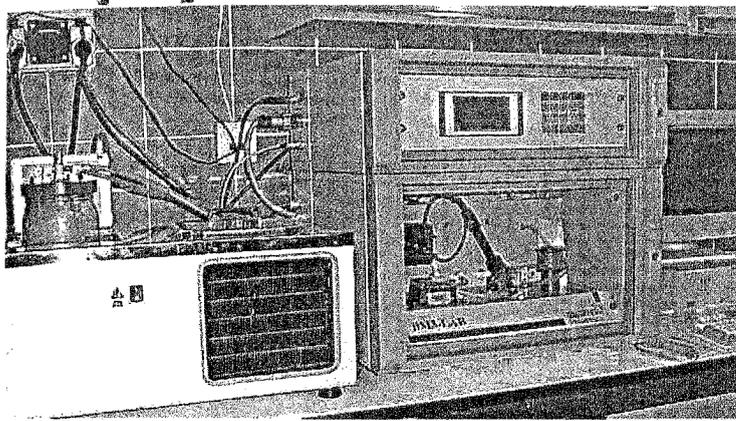
Ya que el consumo de oxígeno está relacionado directamente con las variaciones anteriormente nombradas, la tasa de respiración puede ser utilizada como una herramienta efectiva en el sistema de control y para identificar las perturbaciones que pueden ocurrir.

### Resultados y Discusión

Los métodos anteriormente nombrados han sido utilizados en tres tipos diferentes de sistemas, concretamente ha sido empleado en procesos de lodos activos, en digestores aerobios y en sistemas biológicos con crecimiento de biomasa adherida (RBC, *Rotary Contacting Biological*).

### Resultados obtenidos en procesos de lodos activos

Para comprobar el funcionamiento de las medidas de actividad descritas anteriormente como parámetros de control del sistema de lodos activos, realizándose ensayos se realizaron ensayos tanto a escala industrial como a escala de laboratorio. De los resultados obtenidos se puede concluir:



- \* La medida de la actividad esterasa no es representativa de los procesos que tienen lugar en este sistema, debido a que se puede unir a sustancias inorgánicas y lleva a resultados erróneos. Además la matriz de polímeros extracelulares posee actividad enzimática mostraba de una forma adecuada de los procesos que ocurren en el sistema.
- \* En lo que se refiere a la actividad deshidrogenasa por métodos espectrofotométricos o recuento celular, elegimos este último, debido a que los resultados se obtienen de una forma más rápida y además el seguimiento a la población es más directo, ya que el operador ve físicamente a la población activa presente en el reactor.
- \* La tasa de respiración se mostró como una herramienta muy útil, para prever posibles episodios de inestabilidad además que informa sobre las necesidades de oxígeno de los microorganismos presentes en el sistema de aireación del proceso de lodos activos que pudieran ocurrir en el sistema, mostrándose el SOUR como una herramienta efectiva de control del sistema de lodos activos.

### Digestores Aerobios

En este sentido se ha seguido la evolución de los procesos de digestión aeróbica a lo largo del tiempo en la EDAR del El Torno en Chilana de la Fra, así como distintos estudios a escala piloto encaminados a establecer posibles parámetros e índices de estabilidad a través de medidas de actividad biológica. De los resultados obtenidos en estos estudios podemos realizar las siguientes conclusiones:

- \* La relación o cociente entre la actividad deshidrogenasa y la esterasa (DHA/EA) es un fiel reflejo del proceso de endogénesis que tiene lugar en la digestión aeróbica. Se trata de técnicas sencillas, económicas y rápidas que permiten un control rutinario del sistema, obteniéndose datos sobre el grado de digestión o endogénesis alcanzado así como de rendimientos del sistema.
- \* La relación de células activas frente a totales a través de los fluorocromo CTC y DAPI usando técnicas de microscopía de epifluorescencia se han presentado como métodos poco válidos para evaluar el grado de endogénesis debido a:
  - altos costos del análisis, y alta cualificación técnica,
  - subjetividad del método en el conteo al microscopio, y
  - problemas de asociaciones y cambios de poblaciones inducen a errores de conteo.
- \* Las técnicas respirométricas (SOUR) se presentan como una herramienta eficaz en el control rutinario de estos sistemas aunque presentan el inconveniente de no poder obtener rendimientos de reducción de actividad con respecto al lodo anóxico de partida, y además problemas en las medidas cuando se tratan de altas concentraciones.

### RBC, Sistemas de Contactores Biológicos

Por último, se ha empleado las medidas de actividad como parámetro de control de la biomasa adherida en los biodiscos. En este sistema biológico las medidas de actividad muestran que:

- \* al aumentar el espesor de la biopelícula, tiene lugar un aumento

importante del número total de células, a la vez que se produce una disminución de la biomasa activa aerobia, debido a que en las capas inferiores no llega el oxígeno, pudiendo proliferar únicamente células anaerobias, que no son detectadas a través del fluorocromo CTC, y

- \* la tasa de respiración se muestra como una herramienta útil para el control rutinario de crecimiento de la biopelícula, ya que un descenso de la tasa de respiración, acompañado de un aumento de la biomasa adherida será indicativo aumento del espesor de la biopelícula de los biodiscos.

### Bibliografía

- Awong, J.; Bitton, G. y Koopman, B. 1985. *ATP, Oxigen Uptake Rate and INT-dehydrogenase activity of actinomycete foams*. Water Research 7(19): 917-921.
- Becharés, E. y Soto, F. 1992. *El Test INT-DHA como ensayo de toxicidad en fangos activados 1. Metodología*. Tecnología del Agua nº96;59-63.
- López, J.M.; Kopman, B. and Bitton, G. 1985. *INT-Dehydrogenase test for activated sludge process control*. Biotechnology and Bioengineering, 28: 1080-1085.
- Nelson, P.O. y Lawrence, A.W. 1980. *Microbial viability measurements and activated sludge kinetics*. Water Research 14: 217-225.
- Nybroe, O. and Jorgesen, P. E. 1992. *Enzymes activities in waste water and activated sludge*. Water Research 5 (26): 579-584.
- Rodríguez, G. G.; Phipps, D.; Ishiguro, K. and Ridgway, F. 1992. *Use of a fluorescent redox prob for direct visualization of actively respiring bacteria*. Applied and environmental microbiology, 6(58): 1801-1808.
- Winding, A. and Binnerup, S. J. 1994. *Viability of Indigenous Soil Bacteria Assayed by Respiratory Activity and Growth*. Applied and Environmental Microbiology 60 (8): 2869-2875.