

# EFFECTO DE LAS VARIABLES OPERACIONALES DEL PROCESO DE FANGOS ACTIVOS EN LA ACTIVIDAD EXOENZIMÁTICA DEL GRUPO MYCOLATA

(Dedicado a la memoria del Dr. Gonzalo Cuesta Amat)

Autor: Andrés Zornoza

Programa de Doctorado: Ingeniería del Agua y Medio Ambiente. Universitat Politècnica de València.

Directores: Dra. Susana Serrano y Dr. José Luis Alonso

Colaboradores: Paula Gil, Inmaculada Amorós y Sixti Salas

## 1. INTRODUCCIÓN.

La formación de espumas de origen biológico (*foaming*) se presenta como uno de los problemas más importantes de separación del fango activo que ocurren con frecuencia en las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), disminuyendo la calidad del efluente tratado (figura 1).



Fig. 1 - Espumas biológicas en el reactor biológico y decantador secundario.

Entre las bacterias filamentosas responsables de los episodios de *foaming* se encuentran los actinomicetos no cardiformes productores de ácidos micólicos (grupo mycolata), siendo *Gordonia amarae*-like organisms (GALO) el que mayores problemas ocasiona en las EDAR.

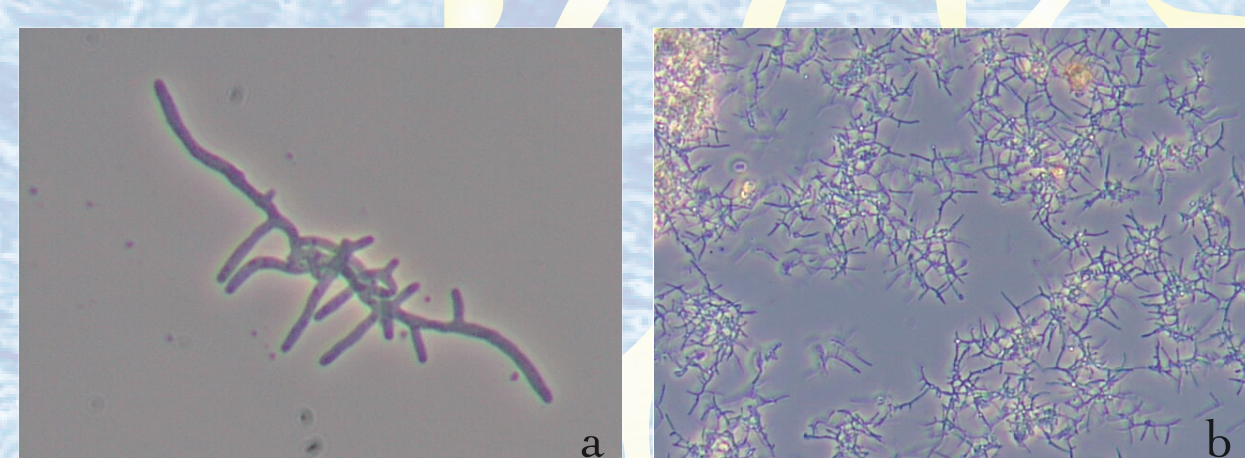


Fig. 2 - Nocardioformes (GALO). Contraste de fases, 400x (a) y 100x (b).

Algunos estudios han detectado actividad exoenzimática (AE) fosfatasa y  $\beta$ -glucuronidasa en bacterias del grupo mycolata, como los géneros *Gordonia* y *Skermania* [1], [5]. Sin embargo, no existen estudios estadísticos multivariantes que relacionen la variación de dicha AE con las condiciones ambientales en las EDAR. El objetivo de este trabajo fue estudiar la relación entre la AE (fosfatasa y  $\beta$ -glucuronidasa) del grupo mycolata y GALO, integrando la técnica de hibridación *in situ* con sondas marcadas con fluoróforos (FISH) y el sustrato ELF 97, y los parámetros operacionales rutinarios de la EDAR. Para ello se efectuó un análisis de redundancia (RDA), basado en un análisis de ordenación ambiental directo del gradiente [4]. Los resultados obtenidos han permitido establecer aquellos parámetros operacionales que explican la variación de las AE, aportando de esta forma nuevos datos para el control de los episodios de *foaming*.

La técnica FISH se basa en la hibridación directa con una sonda complementaria de una región del gen 16S rRNA o 23S rRNA. La sonda está marcada de tal forma que los híbridos formados se pueden detectar fácilmente con un microscopio de epifluorescencia.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS.

Las muestras de fango activo fueron tomadas en 3 reactores biológicos de 2 EDAR (CT1, CT2 y QB) de carga media con problemas de *foaming* durante un periodo de 7 meses (48 muestras). El tratamiento de las muestras en la técnica FISH se realizó según las especificaciones descritas en [5]. Las sondas de oligonucleótidos utilizadas para la identificación de las bacterias filamentosas fueron: Myc657 (mycolata), Gor0596 (*Gordonia* sp.) y Gam205 (*Gordonia amarae*).

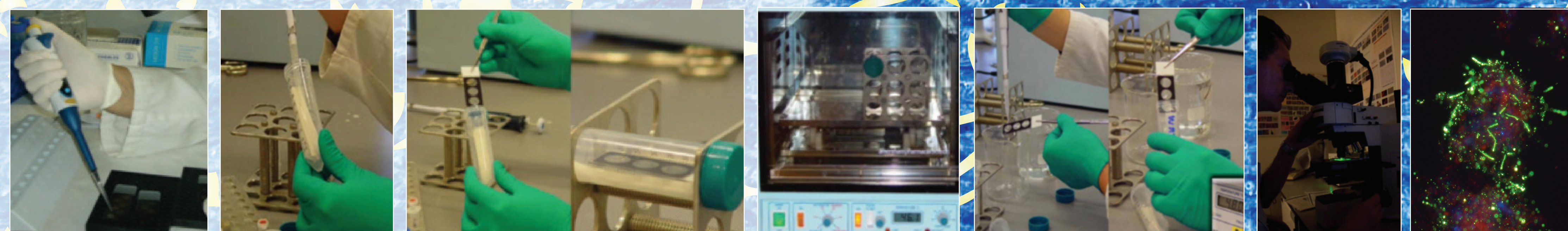


Fig. 3 - Protocolo de hibridación en la técnica FISH.

El índice de abundancia de filamentos (IF) en las muestras se determinó mediante criterio subjetivo basado en una escala ordinal de 0 (ninguno) a 5 (>20 fil/floculo) [3] (tabla 1).

IF	Abundancia	Explicación
0	Ninguno	No se observan
1	Pocos	Se observa en un floculo ocasional
2	Algunos	Comunes pero no presentes en todos los floculos
3	Común	En todos los floculos con una densidad 1-5/floc.
4	Muy común	En todos los floculos con una densidad 5-20/floc.
5	Abundante	En todos los floculos con una densidad > 20/floc.

La presencia de la AE se determinó utilizando el sustrato ELF (ELF-97®), Molecular Probes; www.probes.invitrogen.com) y la metodología descrita en [5]. Se evaluaron las siguientes enzimas: ELF-97®  $\beta$ -D-glucuronidasa (ELF-97®  $\beta$ -D-glucuronide) y ELF-97® fosfatasa (ELF-97® endogenous phosphatase detection kit), y estas se identificaron mediante precipitados de cristales (amarillo-verdoso) visibles en la superficie celular con microscopía de epifluorescencia (figura 4).

El índice de actividad enzimática (IA) detectada *in situ* se evaluó con una puntuación subjetiva clasificando las observaciones en una escala ordinal de 0 (no se detectan células del filamento con actividad enzimática) a 4 (se detecta el 75-100 % de células del filamento con actividad enzimática) (tabla 2).

Índice de actividad	Actividad en el floculo
0	0% actividad
1	0% < actividad $\leq$ 25%
2	25% < actividad $\leq$ 50%
3	50% < actividad $\leq$ 75%
4	75% < actividad $\leq$ 100%

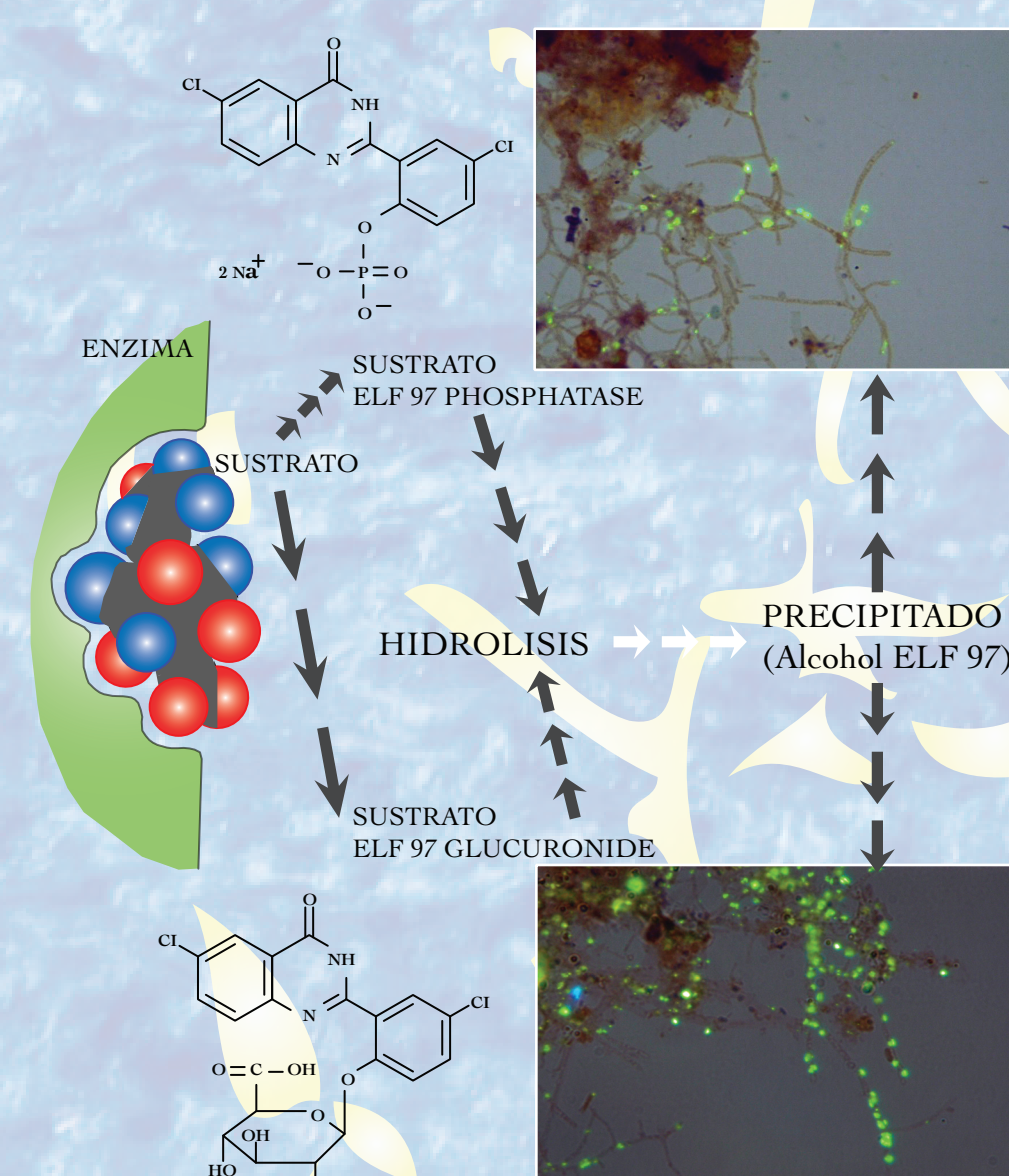


Fig. 4 - Determinación de actividades exoenzimáticas.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Se identificó a *Gordonia amarae* como la especie dominante, dentro del grupo Mycolata y género *Gordonia* sp., en el licor mezcla y en las espumas (figura 5).

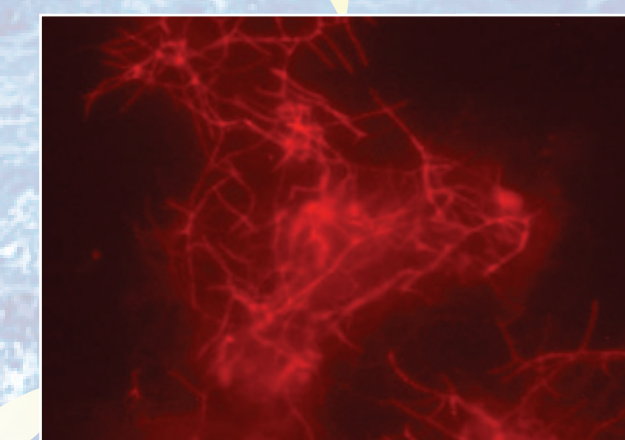


Fig. 5 - *Gordonia amarae*. Sonda Gor205, 1000x (FISH)

CT1 y CT2 presentaron mayor abundancia de filamentos que QB, mientras que esta última mostró un rango más amplio (tabla 4).

Variables biológicas	EDAR QB		EDAR CT1		EDAR CT2	
	Media $\pm$ DE	Rango	Media $\pm$ DE	Rango	Media $\pm$ DE	Rango
<i>Gordonia</i> sp. (Gor0596)	3.9 $\pm$ 1.9	0-5	4.5 $\pm$ 1.1	2-5	4.7 $\pm$ 0.8	2-5
<i>Gordonia amarae</i> (Gor205)	3.9 $\pm$ 1.9	0-5	4.5 $\pm$ 1.1	2-5	4.7 $\pm$ 0.8	2-5
Mycolata (Myc657)	3.8 $\pm$ 1.8	0-5	4.2 $\pm$ 1.2	2-5	4.5 $\pm$ 0.5	4-5
Actividad fosfatasa	1.7 $\pm$ 0.9	0-3	1.8 $\pm$ 0.8	1-3	1.7 $\pm$ 0.8	1-3
Actividad $\beta$ -glucuronidasa	0.8 $\pm$ 0.5	0-2	1.1 $\pm$ 0.3	1-2	1.4 $\pm$ 0.5	1-2

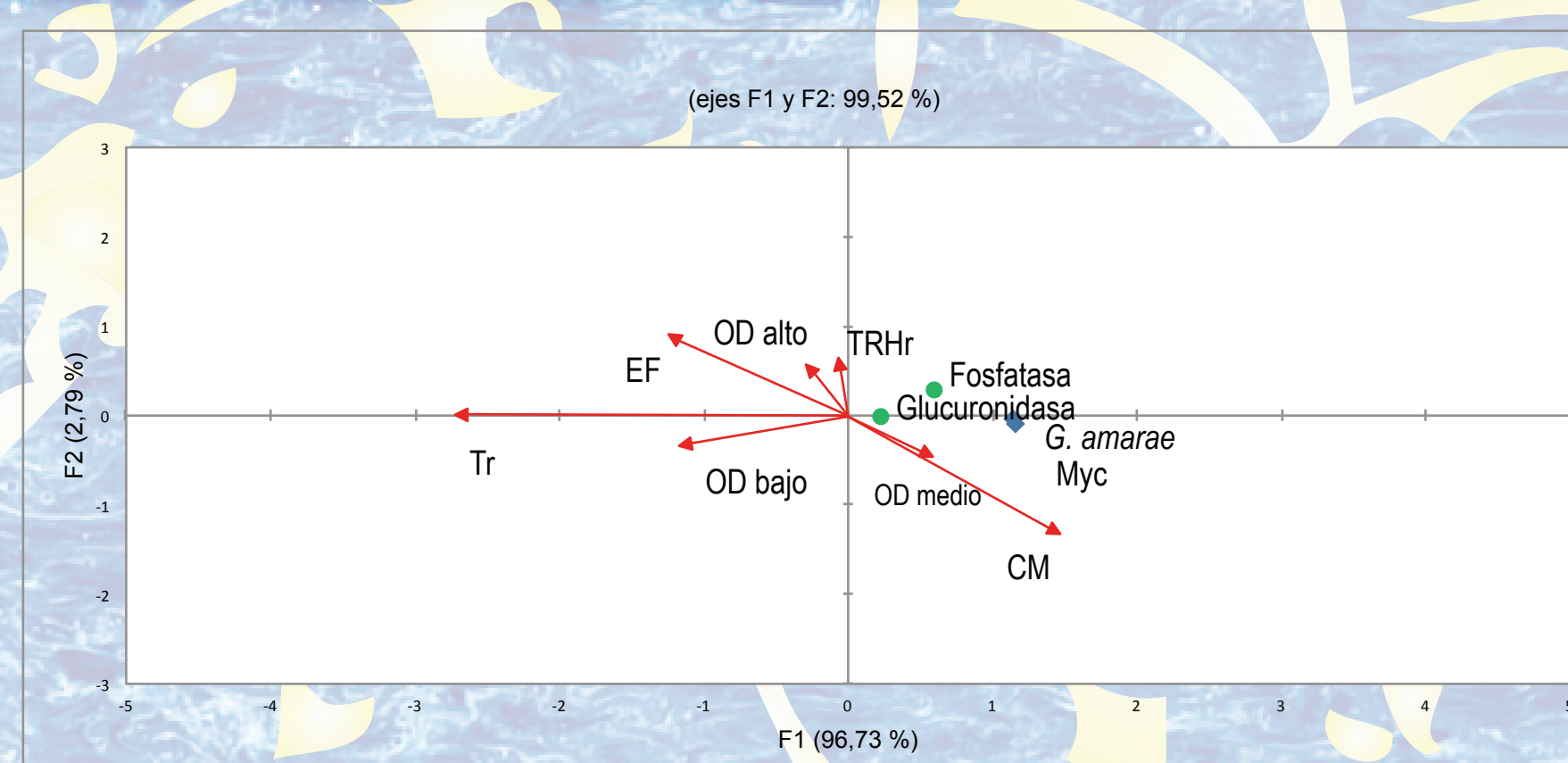


Fig. 6 - Diagrama de ordenación del RDA entre parámetros operacionales y variables biológicas en la EDAR QB.

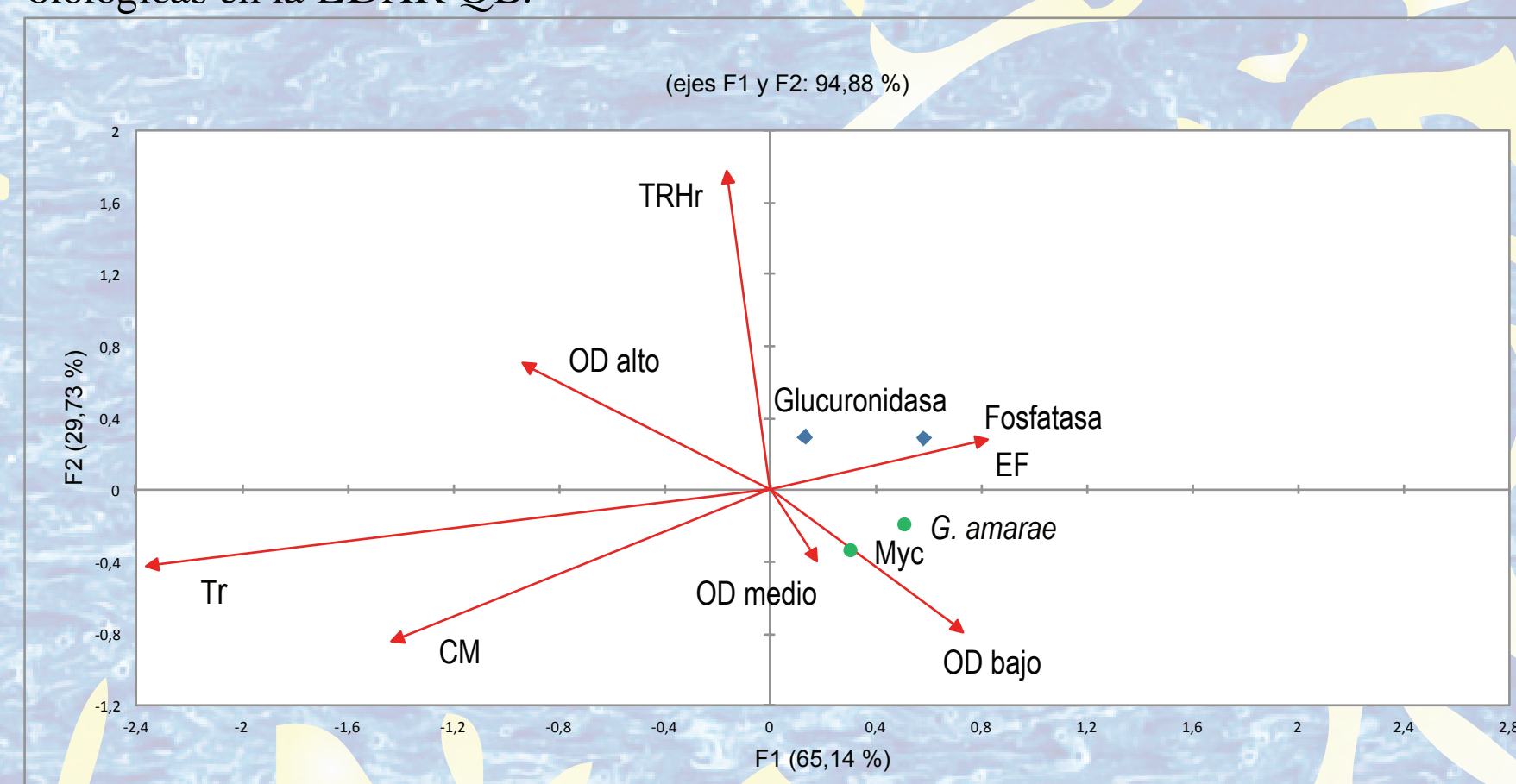


Fig. 7 - Diagrama de ordenación del RDA entre parámetros operacionales y variables biológicas en la EDAR CT.

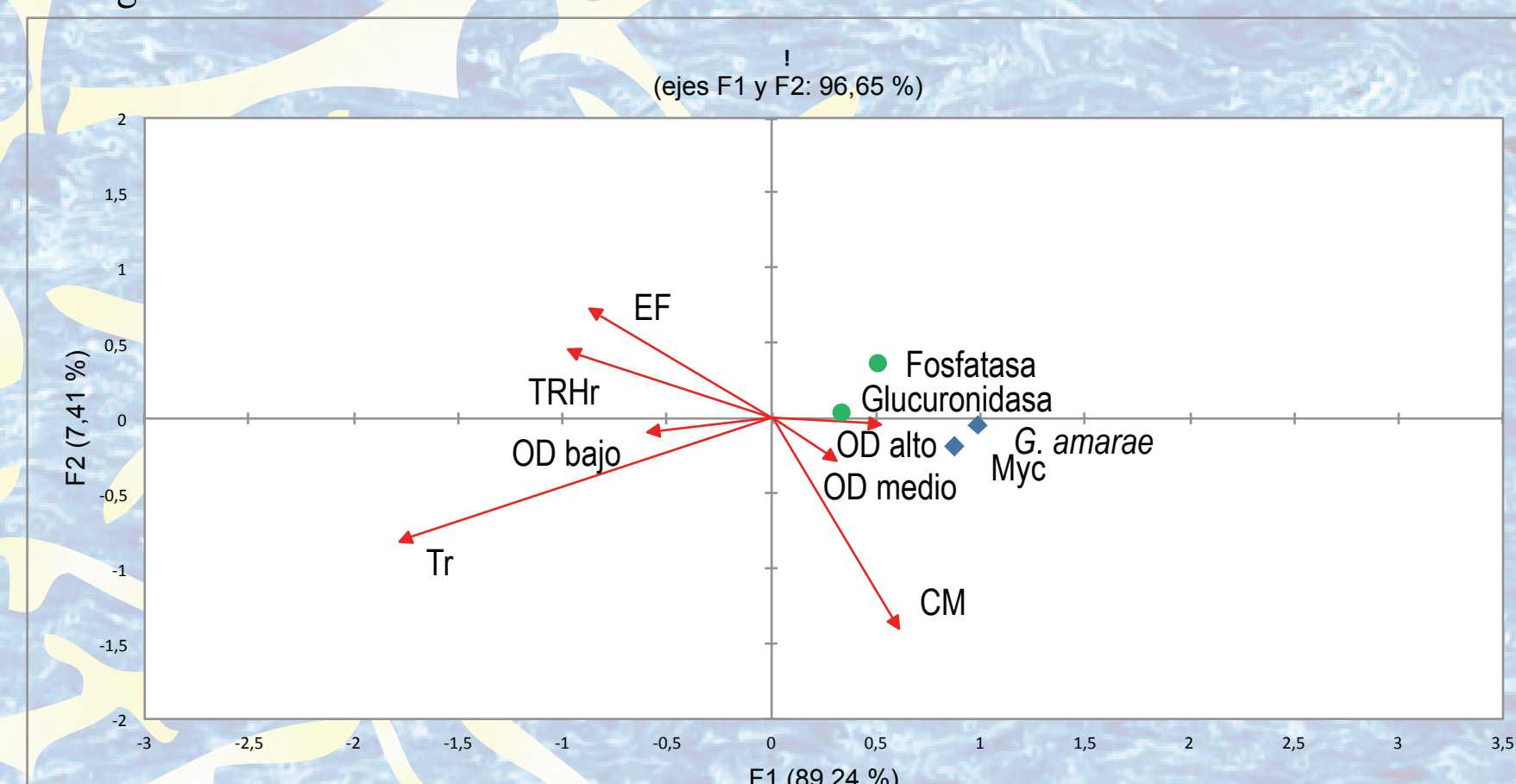


Fig. 8 - Diagrama de ordenación del RDA entre parámetros operacionales y variables biológicas en la matriz global (EDAR CT+QB)

Tr: temperatura en el reactor OD: oxígeno disuelto TRHr: tiempo de retención hidráulico en el reactor EF: edad del fango Myc: mycolata CM: carga másica

## 4. CONCLUSIONES.

\* La presencia de actividad exoenzimática fosfatasa y  $\beta$ -glucuronidasa de *Gordonia amarae* en episodios de *foaming* hacen interesante el empleo de estas técnicas para su control y seguimiento.

\* Según los resultados obtenidos; edad del fango alta, carga másica baja y elevado tiempo de retención hidráulico en el reactor biológico se plantean como posibles estrategias operacionales para el control del *foaming* causado por *Gordonia amarae* en estaciones depuradoras que operan a media carga.

\* La baja temperatura en el reactor se asoció con un elevado índice de actividad exoenzimática fosfatasa y  $\beta$ -glucuronidasa.

## 5. REFERENCIAS.

- [1] Alonso, J.L., Gil, P., Amorós, I., Jones, A.I. and Cuesta, G. (2009) *Extracellular phosphatase and glucuronidase activities of mycolata in activated sludge foam*. 15th International Symposium on the Biology of Actinomycetes, Shanghai (China), 20-25 August 2009.
- [2] Carr, E.L., Eales, K.L. and Seviour, R.J. (2006) Substrate uptake by *Gordonia amarae* in activated sludge foams by FISH-MAR. *Water Science and Technology* 54(1):39-45.
- [3] Eikelboom, D.H. (2000) Process control of activated sludge plants by microscopic investigation. IWA Publishing, London.
- [4] Leps, J. and Smilauer, P. (1999) Multivariate analysis of ecological data. Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice.
- [5] Schade, M. and Lemmer, H. (2006) *In situ* enzyme activities of filamentous scum bacteria in municipal activated sludge wastewater treatment plants. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 34: 480-490.

Los parámetros operacionales utilizados se muestran en la (tabla 3). Los valores de oxígeno disuelto en el reactor fueron distribuidos en tres intervalos (0.8, 0.8-2 y >2 ppm), expresados en porcentaje de tiempo (%).

Parámetros	Unidades	EDAR QB		EDAR CT1		EDAR CT2	
		Media $\pm$ DE	Rango	Media $\pm$ DE	Rango	Media $\pm$ DE	Rango
Temperatura	°C	21 $\pm$ 4	17-29	22 $\pm$ 4	17-29	22 $\pm$ 4	17-29
Carga másica	Kg DBO <sub>5</sub> /Kg SSVLM.d	0.24 $\pm$ 0.10	0.08-0.47	0.29 $\pm$ 0.11	0.14-0.57	0.26 $\pm$ 0.09	0.15-0.51
Tiempo de retención hidráulico	h	16.1 $\pm$ 1.3	14-18	4.2 $\pm$ 0.4	3.7-5.0	5.5 $\pm$ 0.4	5.1-6.2
Edad del fango	días	9.3 $\pm$ 5.7	5-29	5.6 $\pm$ 1.6	3-8	6.7 $\pm$ 2.7	3-12
Oxígeno bajo (< 0.8 mg/L)	%	35 $\pm$ 22	5-69	19 $\pm$ 8	3-34	27 $\pm$ 13	0-50
Oxígeno medio (0.8-2 mg/L)	%	57 $\pm$ 23	12-95	46 $\pm$ 7	31-63	43 $\pm$ 4	36-49
Oxígeno alto (> 2 mg/L)	%	8 $\pm$ 11	0-40	33 $\pm$ 13	10-59	31 $\pm$ 12	13-61

El análisis estadístico directo del gradiente se realizó con el programa XLSTAT-ADA 2013 (Addinsoft). Todas las variables fueron previamente normalizadas con una transformación logarítmica. El test de permutación realizado sugirió la conveniencia de utilizar un método lineal (RDA).