

Resumen

La técnica de viabilidad celular evalúa los daños en la membrana celular, tanto en las bacterias formadoras de flóculo como en las filamentosas, causados por adición de cloro sobre el fango activado afectado por bacteria filamentosas (*Thiothrix*-021N). El estudio fue realizado por la empresa Egevasa en la EDAR de Quart-Benàger (Valencia). Para la identificación de la bacteria filamentosas causante de la alteración macroestructural del flóculo se emplearon criterios sobre las características morfológicas y también tinciones convencionales: Gram, Neisser y polihidroxialcanoatos. Además, se utilizó la técnica de hibridación *in situ* (FISH), para corroborar los resultados obtenidos, identificando de manera inequívoca la bacteria filamentosas responsable de la alteración.

Palabras clave:

Bulking, EDAR, FISH, fango activado, cloración, *Thiothrix*-021N.

Abstract

Suitability of the cellular viability technique as a control tool of the chlorine dosage on the activated sludge of a biological process affected by bulking

This work demonstrates the suitability of the cellular viability technique as a control tool of the chlorine dosage on the activated sludge of a biological process affected by the overabundance of the filamentous bacteria (*Thiothrix*-021N). This technique was used to establish the chlorine dosage according to the observed damages on cellular membranes of both, floc-forming bacteria as well as filamentous bacteria. To identify the filamentous bacteria responsible for the macro-structural alteration of the flocs, several criteria were met, including morphologic characteristics as well as conventional microbiological stains: Gram, Neisser and polyhydroxyalkanoates. FISH was used to confirm the obtained results, providing a definitive identification of the filamentous bacteria responsible for the alteration.

Keywords:

Bulking, WWTP, FISH, activated sludge, chlorination, *Thiothrix*-021N.

Empleo de la viabilidad celular como herramienta para el control de la dosificación de cloro sobre un fango activado con problemas de bulking

Por: **Tatiana Montoya Martínez**, ingeniero sanitario y ambiental¹; **Andrés Zornoza Zornoza**, licenciado en Ciencias Químicas¹; **Pau Granell Muñoz**, ingeniero químico¹; **Gloria Fayos**, licenciada en Farmacia¹; **Vicente Fajardo**, licenciado en Farmacia¹; **Francisco Zorrilla**¹, licenciado en Químicas; **José Luis Alonso Molina**²; **José Juan Morenilla Martínez**, doctor ingeniero industrial³; **Ignacio Bernácer Bonora**, licenciado en Farmacia³; **Francisco J. Martínez Francisco**, licenciado en Ciencias Químicas³

¹ Grupo Aguas de Valencia

Gran Vía Marqués del Turia, 19 - 46005 Valencia
Tel.: 963 390 270 - Fax: 963 931 362
www.egevasa.es

² Universidad Politécnica de Valencia

Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente (IIAMA)
Área de Química y Microbiología del Agua
Camino de Vera, s/n - 46022 Valencia
E-mail: alonso@ihdr.upv.es

³ Entitat de Sanejament D'Aigües de la Comunitat Valenciana (EPSAR)

Comunitat Valenciana (EPSAR)
C/ Álvaro de Bazán, 10, Entlo. - 46010 Valencia
Tel.: 963 604 555 - Fax: 963 603 469
<http://epsar.cop.gva.es>

1. Introducción

Uno de los problemas comúnmente encontrados en los reactores biológicos de las estaciones depuradas de agua residual (EDAR) es el bulking filamentosos. Éste se origina por un crecimiento excesivo de determinadas bacterias filamentosas, que provoca una descompensación del flóculo a nivel macroestructural. Si bien una baja proporción de bacterias filamentosas puede ser beneficiosa para el flóculo, un crecimiento desmesurado deteriora el proceso de separación de la biomasa del agua residual

tratada en los decantadores secundarios (Kanagawa y col., 2000).

Para el control del bulking filamentosos se utilizan diferentes métodos químicos, como la adición de peróxido de hidrógeno, ozono y cloro. Este último método es el más empleado debido a las ventajas que presenta: disponibilidad del producto, su poder desinfectante y bajo coste. En cualquier caso, ninguno de estos métodos permite actuar únicamente y de manera selectiva sobre la bacteria filamentosas de interés. Para reducir el bulking filamentosos por el método de cloración

es importante, por un lado, identificar el tipo de bacteria filamentososa causante del episodio, pues no todas son susceptibles a la cloración y, por otro, controlar la integridad del flóculo y su resistencia ante el agente químico.

Las primeras claves de identificación para los microorganismos filamentosos observados en las EDAR fueron propuestas en los años setenta por Eikelboom, quien los agrupó en morfotipos (grupos), la mayoría de los cuales son nombrados con un código de cuatro cifras en función de unas características morfológicas comunes y de las respuestas a tinciones diferenciales. En la actualidad, los estudios realizados por Jenkins y col. (2004) y Eikelboom (2000) sirven de referencia para la identificación convencional de microorganismos filamentosos. Esta forma de identificación no es específica porque pueden existir bacterias morfológicamente iguales y con similar respuesta a tinciones, pero ser genéticamente distintas. Por este motivo, es necesario complementar la información obtenida en la identificación convencional con el empleo de técnicas moleculares basadas en el análisis del ADN y ARN (hibridación *in situ* - FISH) aplicadas a los sistemas de tratamiento biológico de agua residual (Amann y col., 1995).

La técnica de FISH se basa en la hibridación directa de la bacteria diana con una sonda complementaria de una región del gen 16S ARNr o 23S ARNr. El elevado número de moléculas de ARNr (103-105) es una ventaja en la aplicación de la técnica de hibridación al aumentar su sensibilidad (Amann y col., 1995). Una secuencia de DNA (sonda) puede unirse con una secuencia de ARN complementaria (16S ARNr o 23S ARNr) y se produce un híbrido ADN:ARN. La sonda está marcada con un fluorocromo en el extremo 5', de tal forma que los híbridos formados se pueden detectar fácilmente con un microscopio de epifluorescencia. La especificidad

de las sondas puede ser ajustada a diferentes niveles taxonómicos, como son dominio, *phylum*, clase, familia, género, especie para la identificación de las bacterias (Amann y col., 1995).

Durante la dosificación de cloro es necesario controlar la integridad del flóculo, dado que este agente biocida afectará en mayor o menor medida a todos los microorganismos presentes. Una dosificación excesiva afectaría de manera irreversible a las bacterias formadoras de flóculo, lo que conllevaría el deterioro del proceso biológico de depuración. Para detectar daños en la membrana celular de las bacterias se utiliza la técnica de viabilidad celular.

*Durante
la dosificación
de cloro es
necesario controlar
la integridad
del flóculo*

La rápida reacción química del cloro con otros compuestos hace que sea necesario alcanzar una buena y rápida mezcla con el fango activado, puesto que una mezcla deficiente conllevaría elevados consumos de cloro sin llegar a controlar el bulking. Los puntos más recomendados para la adición de cloro son: directamente en el tanque de aireación y en la recirculación interna o externa (Jenkins y col., 2004).

En este trabajo se presenta la estrategia seguida para solucionar un episodio severo de bulking ocasionado por la excesiva presencia de la bacteria filamentososa *Thiothrix*-021N que afectó a la EDAR de Quart-Benàger. Esta estrategia se basó, en primer lugar, en la identificación de la bacteria responsable del episodio de bulking mediante

técnicas convencionales y posterior confirmación inequívoca mediante FISH y, en segundo lugar, su erradicación mediante la dosificación controlada de cloro por medio de la técnica de viabilidad celular.

2. Materiales y métodos

El estudio se realizó en la EDAR de Quart-Benàger, que está situada en la provincia de Valencia y a la que le llegan aguas residuales de carácter doméstico e industrial. Esta EDAR consta de un pretratamiento que incluye tres balsas de homogenización, cuatro decantadores primarios (TRH: 5,5 h), cuatro reactores biológicos (TRC: 9 días, TRH: 5,5 h), cuatro decantadores secundarios (TRH: 7,5 h) y un tratamiento terciario por ultravioleta para la desinfección del efluente. La estabilización de fangos se realiza en tres digestores anaerobios. El caudal total promedio de tratamiento es de 35.200 m³/d y la relación media DBO₅/DQO de entrada al proceso biológico es de 0,57.

2.1. Determinaciones físicoquímicas

La determinación del índice de volumen del fango diluido (IVFD) se realizó según el procedimiento descrito por Jenkins y col. (2004). El resto de determinaciones se realizaron según recomienda el *Standard Methods* (APHA y col., 1998): índice de volumen del fango (IVF), V₃₀, sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV), demanda biológica de oxígeno (DBO) y demanda química de oxígeno (DQO).

2.2. Determinaciones microbiológicas

La observación óptica se realizó con un microscopio de contraste de fases, Zeiss modelo Axiostar con objetivos de 10x, 20x, 40x y 100x aumentos, equipado de microfotografía. La identificación de la bacteria filamentososa causante del episodio de bulking se realizó siguiendo las claves de identificación de mor-

Tabla 1

Sondas	Secuencia (5'-3')	Nivel/Grupo	% FA ^a	Referencia
EUB 338	GCTGCTCCCGTAGGAGT	Bacteria	20%	Amann y col. (1990)
GAM 42a	GCCTTCCCACATCGTTT	γ -Proteobacteria	35%	Manz y col. (1992)
CBET 42a	GCCTTCCCACATCGTTT	c para Gamma ^b	35%	Manz y col. (1992)
HGC69a	TATAGTTACCACCGCCGT	Actinobacteria	25%	Roller y col. (1994)
G123T	CCTTCGATCTCTATGCA	Thiohrix	40%	Kanagawa y col. (2000)
G2M	GCACCACGACCCCTTAG	<i>T. eikelboomii</i>	35%	Kanagawa y col. (2000)
TEI	TCCCTCTCCCACATCTA	C para TNI ^c	40%	Kim y col. (2002)
NLIMII175	GGCTCCGTCCTCGTATCCG	<i>T. japonica</i> ^d	20%	Liu y Seviour (2001)
NLIMII 192	AGACTTCCAGACAGGAG	<i>N. limicola</i> II ¹⁰	40%	Liu y Seviour (2001)
Mpa-all-1410	GGTGTGTGCGACTTTCGGCG	<i>Microthrix</i>	35%	Levantesi y col. (2006)

Nota: a, porcentaje de formamida; b, competidora para GAM 42a; c, competidora para G123T; y d, *Tetrasphaera japonica*.

Tabla 1. Sondas empleadas en la hibridación para identificar el microorganismo causante del bulking.

fototipos propuestas por Eikelboom (2000) y Jenkins y col. (2004). La confirmación genética del grupo y especie de bacteria filamentosas se realizó mediante FISH.

2.3. Hibridación in situ (FISH)

Esta técnica permite la identificación de bacterias que pertenecen a un nivel taxonómico específico. Se han utilizado sondas de ADN marcadas con fluorocromos, que se unen a la fracción del gen 16S ARN ribosómico de la bacteria filamentosas en el fango activo, produciendo una fluorescencia en las bacterias con la fracción de ARN ribosómico coincidente.

filamentosas que las técnicas convencionales, porque se basa en secuencias de nucleótidos específicas de las bacterias o grupos de bacterias que se quieren identificar. En la **Tabla 1** se presentan las sondas empleadas, la secuencia de nucleótidos, el grupo y el porcentaje de formamida (FA) óptimo para la hibridación.

2.4. Tinción con fluorocromos para determinar la viabilidad celular

Para realizar el control de la viabilidad, tanto de las bacterias filamentosas como de las bacterias formadoras de flóculo, se empleó el Live/Dead BacLight (BL) Viability kit (Molecular Probes Inc., 1998). En este método se emplean dos fluorocromos, el SYTO 9 (tinción verde) y el yoduro de propidio (PI, tinción roja). Cuando la membrana bacteriana se encuentra en buen estado (bacteria viable), la molécula de SYTO 9 es capaz de entrar en la célula, prevaleciendo una coloración verde. Si, por el contrario, la membrana celular está alterada (célula muerta o dañada), la molécula de PI entrará en la célula y desplazará a la molécula de SYTO 9, presentando un color rojo.

2.5. Dosificación de cloro

La dosificación de cloro se realizó en el punto de mezcla de la recirculación externa del fango con el efluente de los decantadores primarios (**Figura 1b**, antes de los tornillos de Arquímedes), dada la imposibilidad de dosificar directamente sobre la recirculación, lugar en donde la adición de cloro sería más efectiva. Para garantizar en todo momento la dosificación, se instalaron dos bombas (1+1) y 4 depósitos de hipoclorito de 1.000 l, conectando cada una de las bombas a dos depósitos. La dosificación se realizó mediante una tubería perforada de polietileno de pulgadas a lo largo de todo la arqueta previa a los tornillos de Arquímedes (**Figura 1a**). Diariamente fueron aforadas las bombas para garantizar la dosis aplicada.

Para el cálculo de la dosis de cloro se siguieron las recomendaciones descritas por Ramírez y col. (2000), que se basan en el cálculo de diferentes parámetros de funcionamiento tales como: caudal de recirculación (Q_{RAS} , m³/d), concentración de sólidos suspendidos en la recirculación (SS_{RAS} , mg/l), sólidos suspendidos totales del sistema, que incluye tanto los sólidos de los reactores como de los decantadores

La técnica FISH permite la identificación de bacterias de un nivel taxonómico específico

Esta técnica resulta más fiable para la identificación de bacterias

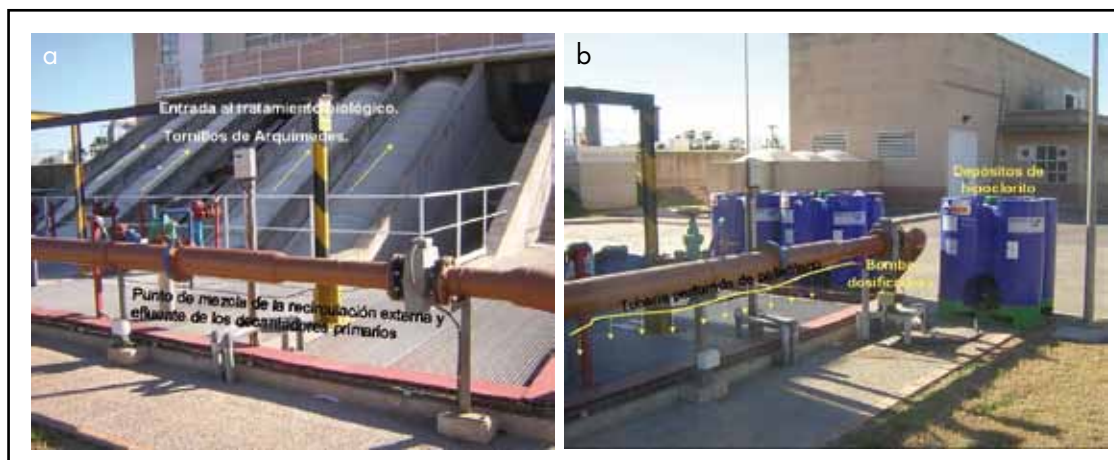


Figura 1. Dosificación de cloro en la arqueta de entrada al tratamiento biológico (a); y depósitos de hipoclorito (b).

secundarios (SS_{sistema} , mg/l). A partir de estos parámetros se calcula el factor de frecuencia (F), que indica el número de veces que el fango pasa por el punto de dosificación en un día, mediante la **Ecuación 1**. Ramírez y col. (2000) recomiendan valores de F superiores a 2,5.

$$F = \frac{(Q_{\text{RAS}} \times SS_{\text{RAS}})}{(1.000 \times SS_{\text{sistema}})} \quad (\text{Ec1})$$

Calculado el valor F, se determina el volumen de hipoclorito necesario (VH, l/d). Éste se obtiene a partir de la concentración de cloro como hipoclorito (C_{CL} , g Cl/l), los sólidos suspendidos volátiles totales del sistema (SS_{VS} , kg) y la dosis de cloro (D, g Cl/kg SS_{Vd}). La dosis de cloro se estableció a partir de experiencias realizadas por otros autores (**Ecuación 2**).

$$VH = (SS_{\text{VS}} \times D) / C_{\text{CL}} \quad (\text{Ec.2})$$

3. Resultados

Los resultados experimentales que se muestran en este trabajo fueron obtenidos en la EDAR de Quart-Benager durante el período en que se produjo el continuo deterioro del proceso biológico causado por un crecimiento excesivo de bacterias filamentosas, bulking filamentoso, y su posterior recuperación como consecuencia de las acciones que se realizaron: seguimiento continuo del estado del fango biológico

(determinaciones fisicoquímicas y microbiológicas), identificación del microorganismo causante del deterioro del proceso y adición controlada de cloro.

La utilización de cloro como biocida sobre la recirculación de fango activado, procedente del tratamiento biológico es una práctica frecuente en EDAR con problemas de bulking filamentoso, aunque su aplicación no permite un control específico sobre una población bacteriana determinada. Antes de llevar a cabo la adición del agente biocida al fango activado es necesario conocer de forma inequívoca el tipo de bacteria filamentosa causante del problema de bulking, pues no todos los morfotipos de bacterias filamentosas son susceptibles al proceso de cloración.

Tras observar un continuo deterioro de las características de sedimentación del fango, se intensificó el seguimiento microbiológico del fango con el objetivo de identificar la bacteria causante de este deterioro. En la visualización en contraste de fases del fango se observaba que esta bacteria formaba puentes interfloculares, con formas ligeramente curvadas (**Figura 2a**). Su crecimiento principalmente fuera del flóculo la sitúa en condiciones ventajosas frente al resto de microorganismos (Martins y col., 2004). Los filamentos tenían una longitud superior a 200 μm (diámetro aproximado 1,0 -2,0 μm) y morfo-

logía celular cuadrada-discooidal, sin crecimiento epifítico (**Figura 2b**).

La respuesta a las tinciones Gram (**Figura 2c**), Neisser (**Figura 2d**) y gránulos de polifosfato (**Figura 2f**) fue negativa. Con la tinción Gram se observaron alternancias de espacios más intensos, aspecto característico del tipo 021N. Aunque la tinción Neisser fue negativa, ésta puso de manifiesto la presencia de gránulos Neisser positivo, color azul-violeta (**Figura 2d**, flecha amarilla), lo que indica acumulación de sustancias de reserva.

Con la tinción Sudan Black (**Figura 2e**) se observó la presencia de gránulos de polihidroxialcanoatos teñidos de color negro o azul oscuro. Este material intracelular puede ser metabolizado para la generación de energía o producción de proteínas durante los periodos en que el sustrato se encuentra en muy bajas concentraciones (limitante), convirtiéndose por tanto en una ventaja selectiva frente a otras bacterias filamentosas y no filamentosas.

La observación microscópica del fango en contraste de fases, junto con las tinciones Gram, Neisser y Sudán Black, apuntaban a que el bulking filamentoso estaba producido por el tipo 021N. Sin embargo, este tipo de identificación morfológica presenta limitaciones, puesto que muchas bacterias filamentosas pueden cambiar en su morfología como respuesta a los cambios producidos en las condiciones medio

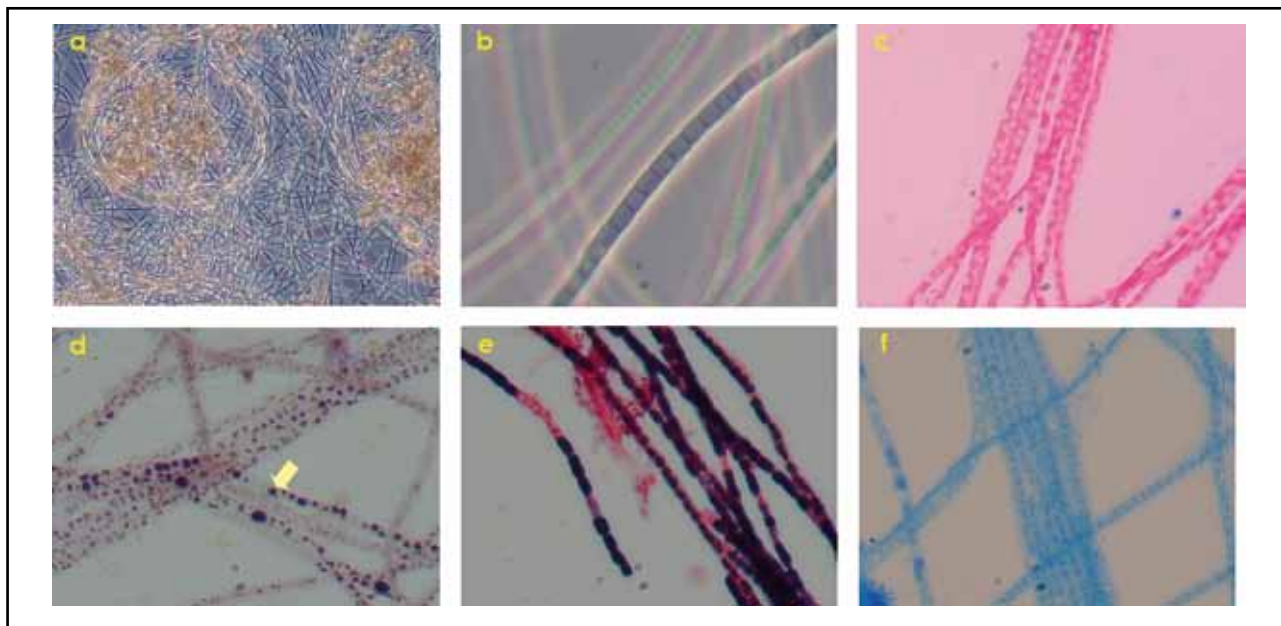


Figura 2. Características morfológicas y estructurales de la bacteria filamentosas: visualización en contraste de fases, 100x (a); visualización en contraste de fases, 1.000x (b); tinción Gram, 1.000x (c); tinción Neisser, 1.000x (d); tinción Sudan Black., 1.000x (e); y tinción de polifosfatos, 1.000x. (f).

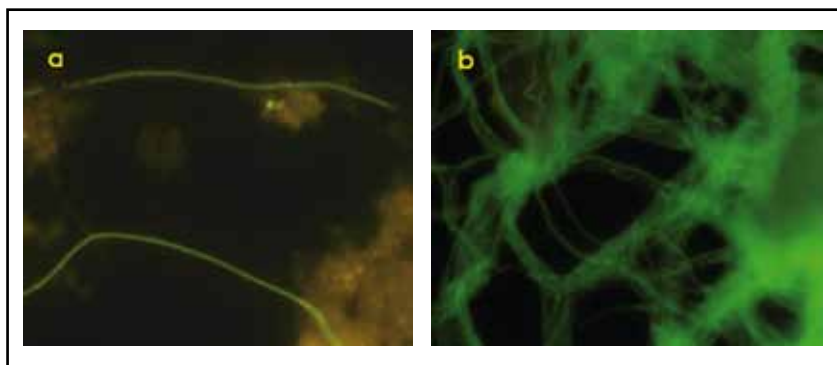


Figura 3. Hibridación de la bacteria filamentosas: sonda G123T para la identificación de bacterias filamentosas del género *Thiothrix*, 600x (a); y sonda G2M para la identificación de *Thiothrix eikelboomii* sp. nov., 600x (b).

*El bulking
filamentoso es uno
de los problemas
más frecuentes
en las EDAR y
la solución a adoptar
es diferente
en cada caso*

ambientales, y aunque algunas de ellas pueden parecer morfológicamente la misma, varían considerablemente en su fisiología y taxonomía (Seviour, y col., 1997). Para corroborar el resultado obtenido por las técnicas convencionales se empleó la técnica FISH (**Figura 3**), que permite la correcta e inequívoca identificación de la bacteria, siempre que se emplee la sonda específica correspondiente.

Las hibridaciones se realizaron con las diferentes sondas presentadas en la **Tabla 1**. La bacteria causante de la espumación del fango fue *Thiothrix eikelboomii* sp. nov. (grupo *Thiothrix*-021N).

Otros estudios realizados en plantas con problemas de bulking filamentoso han hecho posible identificar algunos de los factores que favorecen al esponjamiento del fango, tales como: el déficit de nutrientes, la deficiencia de oxígeno, la presencia de componentes reducidos de azufre (Jenkins y col., 2004). El bulking filamentoso continúa siendo uno de los problemas más frecuentes en EDAR y la solución a adoptar es diferente en cada caso.

Con el objetivo de relacionar algunos de los parámetros físico-químicos y operacionales del proceso biológico con los instantes de tiempo en que fueron realizados los

cambios operacionales y las dosificaciones de cloro, en la **Figura 4** se representa la evolución de los SSV del fango (SSVLM), la concentración de cloro añadido, el tiempo de retención celular (TRC), el IVFD y la DQO a la entrada del reactor biológico (DQO_{dec}). Asimismo, se indican los instantes de tiempo en los cuales fueron realizadas las distintas actuaciones sobre el proceso.

Los primeros 17 días (**Figura 4**), corresponden a las condiciones de partida, período durante el cual la biomasa se encontraba estable. Entre los días 18 y 58 el crecimiento de la bacteria filamentosas aumentó excesivamente, llegando a afectar

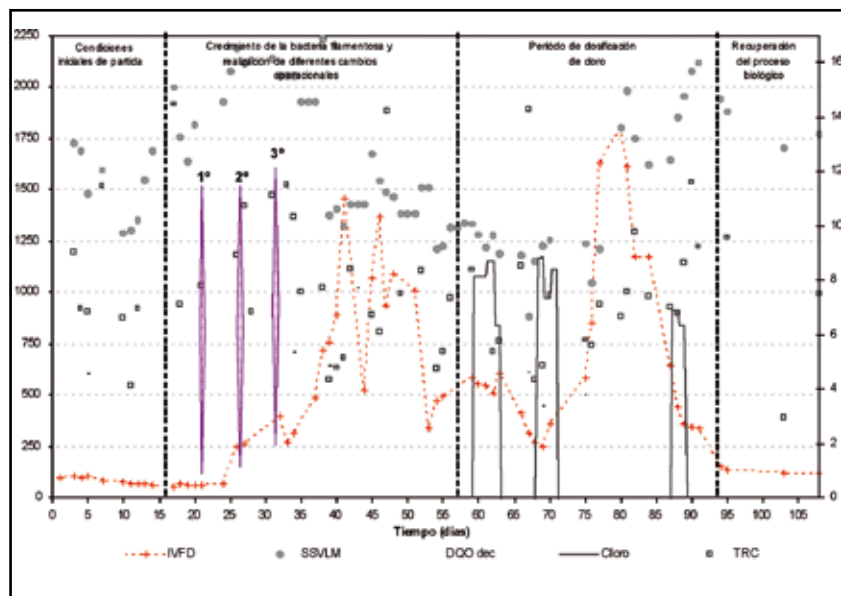


Figura 4. Evolución del IVF, SSVLM, DQO a la entrada del reactor biológico, dosis de cloro y las actuaciones operacionales realizadas.

negativamente a las características del efluente. Durante este período se realizaron distintos cambios operacionales con objeto de reducir la presencia de filamentos. Entre los días 59 y 89 se realizaron tres dosificaciones de cloro a distintas concentraciones. En los últimos 21 días se presenta la evolución y recuperación del proceso biológico.

Durante los primeros 17 días del período experimental, cuando aún el proceso biológico no se había visto afectado, la concentración SS en el efluente (SS_{ef}) era inferior a 10 mg/l. Los valores del IVF se encontraron en torno a 100 ± 15 ml/g, parámetro indicativo de la buena calidad de sedimentabilidad del fango. Este valor fue tomado como valor de referencia una vez terminado el período de cloración.

Al comienzo del bulking filamentoso, la calidad del efluente no se vio afectada, ya que las pequeñas partículas dispersas fueron filtradas y fijadas sobre la bacteria filamentosa (*Thiothrix 021N*). En los días 18, 19 y 20 hubo problemas con el suministro de oxígeno disuelto a los reactores biológicos, dando origen a un sistema biológico pobremente aireado que favoreció el desarrollo de la bacteria filamentosa.

Además, esto coincidió con un aumento de la carga contaminante de entrada al sistema biológico (**Figura 4**) debido, por un lado, al aumento de vertidos lixiviados procedentes de una planta de tratamiento de residuos sólidos y, por el otro, a la rotura de una tubería interna que transportaba el fango proveniente del decantador primario al espesador de gravedad. Esta rotura se produjo cerca del canal que recoge el clarificado del espesador, por tanto, el sobrenadante del espesador correspondió a un sobrenadante del espesador más fango primario. Ambas corrientes fueron recirculadas a la entrada de la planta depuradora.

El problema de bulking fue cada vez más severo, hasta el punto que los filamentos dominaron tanto el espacio intraflocular como extraflocular. Este incremento provocó valores de IVF en torno de 200 ml/g, valor asociado a problemas de bulking (Pujol y col., 1990). Algunos estudios reflejan que existe una buena correlación entre IVF y la longitud total del filamento e incluso entre el IVF y el número de filamentos (Palm y col., 1980).

Se realizaron varios cambios operacionales sobre la consigna de oxígeno en los reactores, la carga

másica y el tiempo de retención celular, cambios que no repercutieron en mejoras consistentes del proceso biológico. El primer cambio operacional (día 23) consistió en el aumento de la concentración de oxígeno disuelto de 2,2 a 2,9 mg/l. Posteriormente se puso en funcionamiento un reactor auxiliar (día 27) de 6.750 m³ (anóxico-aerobio). Este cambio permitió reducir la carga contaminante de entrada a los reactores biológicos y mitigar los cambios de la carga contaminante. Esta medida estaba condicionada a la finalización de unas obras de ampliación.

En el último cambio operacional, día 33, se redujo el TRC y, por tanto, la concentración de SSVLM. Con este cambio se buscó eliminar una gran cantidad de fango afectado. Sin embargo, el esponjamiento del fango continuó aumentando, hasta alcanzar valores de IVFD de 1.454 ml/g. Los valores de DBO₅ de entrada al proceso biológico oscilaron entre 310 y 680 mg/l, con una media de 463 mg/l, valores que continuaron favoreciendo el crecimiento filamentoso.

Los distintos cambios operacionales realizados no repercutieron en una notable reducción de bacterias filamentosas. Debido al continuo aumento de los valores de IVF y el progresivo deterioro de la calidad del efluente se optó por la aplicación de cloro sobre la salida de la recirculación externa del fango. A lo largo de este período fueron realizadas un total de tres dosificaciones de cloro comprendidas entre 6,30 y 8,82 g Cl/kg SSVLM*d, cuyo efecto sobre el estado del fango biológico del proceso fue supervisado mediante la técnica de viabilidad celular. Esta técnica permite valorar en todo momento la integridad de la membrana celular, evitando de esta forma, daños irreparables en las comunidades bacterianas y, por tanto, en el proceso de depuración del agua residual.

Se realizó una prueba de viabilidad antes de la primera dosificación

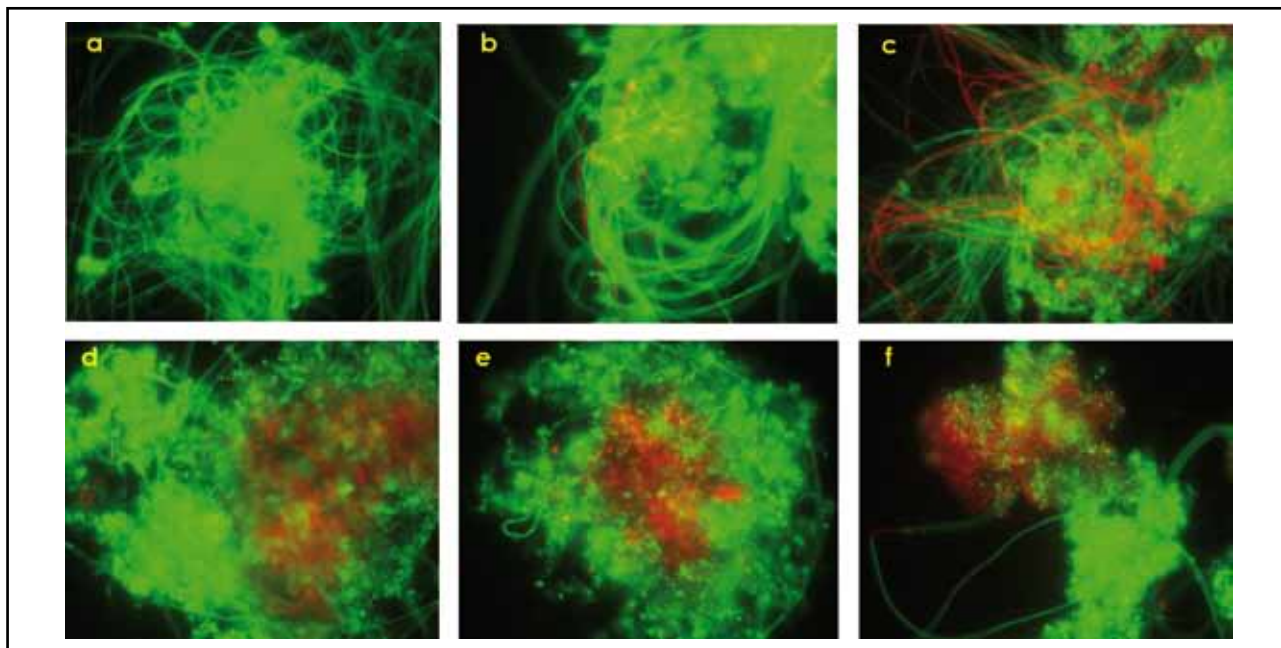


Figura 5. Seguimiento de la adición de biocida al fango a partir de la prueba de viabilidad celular.

de cloro que se emplearía como control (**Figura 5a**) para las siguientes muestras procesadas. Las distintas muestras de fango analizadas por la técnica de viabilidad celular durante el período de cloración sirvieron

Tras una primera cloración, la consistencia del flóculo fue más débil y la calidad del efluente se vio deteriorada

para determinar el grado de afectación del biocida sobre la población bacteriana y estimar los períodos de duración de aplicación de cloro.

La adición del biocida se realizó durante nueve días, distribuidos en tres períodos. Durante el primer período, entre los días 59 (**Figura 5b**) y 63 (**Figura 5c**), la concentración de cloro adicionada se encontró en-

tre 6,30 y 8,69 g Cl/kg SSVLM*d. La **Figura 5c** muestra una cantidad importante de filamentos dañados identificados de color rojo.

Tras la primera cloración, la consistencia del flóculo fue más débil y la calidad del efluente se vio deteriorada, obteniéndose un efluente más turbio y con una mayor concentración de sólidos suspendidos. En esta etapa se tuvo un ligero descenso de los valores del IVFD, pero no el suficiente como para alcanzar una buena sedimentabilidad del fango. La defloculación fue también contrastada con las observaciones microscópicas del fango en campo claro y contraste de fases.

El segundo período de dosificación de cloro se realizó entre los días 68 y 71, con una dosis variable entre 7,33 y 8,82 g Cl/kg SSVLM*d. El efecto de la adición de cloro se reflejó sobre algunas zonas del flóculo (**Figura 5d**), por lo que se estableció como dosis máxima a emplear 8,82 g Cl/kg SSVLM*d. La observación microscópica mostró un flóculo menos consistente, de estructura abierta y abundantes zonas aerobias, de pequeño tamaño y sin un núcleo bien definido. Es importante resaltar que parte de la

concentración de cloro adicionado para el control de las bacterias filamentosas es también consumido por la materia orgánica presente, por lo que la dosis óptima efectiva para la eliminación de estas bacterias se encuentra por debajo de los valores indicados.

Tras la segunda adición de biocida, una elevada cantidad de filamentos fueron dañados, mostrando una pérdida celular de los tricomas, dejando visible la vaina. El máximo valor obtenido del IVFD durante esta etapa fue de 360 ml/g. El tercer y último período de adición de biocida se llevó a cabo entre los días 87 y 89 con una dosis de biocida variable, entre 6,33 y 6,76 g Cl/kg SSLM*d. Los valores de IVFD comprendidos en esta etapa se redujeron, pasando de 640 a 356 ml/g. Los resultados de viabilidad mostraron que tanto el flóculo bacteriano como las bacterias filamentosas habían sido seriamente afectados (**Figura 5e** y **Figura 5f**), por lo que la cloración fue suspendida. La información obtenida mediante la técnica de viabilidad celular permitió controlar en todo momento el grado de afectación al que fue sujeta la comunidad biológica del fango,

convirtiéndose esta técnica en una herramienta práctica en el campo de la depuración de aguas residuales.

Los resultados obtenidos en este estudio ponen de manifiesto que para concentraciones de cloro en el intervalo de 6,30 y 8,82 g Cl/kg SSVLM*d se consigue una importante reducción en la población de las bacterias identificada como *T. eikelboomii* sp. nov. (grupo *Thiothrix*-021N). Esta reducción se vio reflejada en una mejora significativa de las características de sedimentabilidad del fango (valorada a través del IVF) y, consecuentemente, en una mejora de la calidad del agua effluente.

4. Conclusiones

La proliferación excesiva de bacterias filamentosas en el fango biológico (bulking filamentoso) afecta negativamente a sus características de sedimentabilidad, provocando un deterioro de la calidad del effluente. Para poder controlar y solucionar satisfactoriamente un episodio de bulking filamentoso es necesario identificar el tipo de bacteria filamentosa causante de dicho episodio. Las técnicas microbiológicas convencionales son una herramienta útil para realizar esta tarea de identificación, pero es necesario complementarlas con el empleo de otras técnicas moleculares para asegurar la correcta e inequívoca identificación.

En este estudio se ha mostrado la estrategia seguida para solucionar un episodio severo de bulking ocasionado por la presencia excesiva de la bacteria filamentosa *Thiothrix eikelboomii*, perteneciente al grupo *Thiothrix*-021N, identificada de forma inequívoca mediante la técnica de hibridación in situ (FISH). Esta bacteria fue susceptible a la adición de cloro aplicado como biocida en concentraciones en torno a 8,8 g Cl/kg SSVLM*d.

La adición de cloro afecta también a los microorganismos que llevan a cabo proceso de depuración, por lo que durante la cloración es

necesario controlar la integridad del flóculo y su resistencia ante el agente químico. Esto se puede realizar mediante la técnica de viabilidad celular que permite detectar daños en la membrana celular tanto de las bacterias formadoras de flóculo como de las filamentosas.

En este trabajo se ha demostrado la idoneidad de la técnica de viabilidad celular como herramienta para el control de la dosificación de cloro. Los resultados obtenidos mediante esta técnica permitieron supervisar y valorar de manera exhaustiva la viabilidad y el grado de afección del fango durante el proceso de cloración. La información obtenida mediante esta técnica la propone como una valiosa herramienta práctica en el campo de la depuración de aguas residuales.

5. Agradecimientos

Se agradece la colaboración de la Entidad Pública de Saneamiento de la Generalidad Valenciana (EPSAR) y al Grupo Aguas de Valencia por su apoyo y respaldo a nuestro trabajo.

6. Bibliografía

- [1] Amann, R.I.; Binder, B.J.; Olson, R.J.; Chisholm, S.W.; Devereux, R.; Stahl, D.A. (1990). 'Combination of 16S rRNA targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations'. Appl. Environ. Microbiol. 56 (6), 1.919-1.925.
- [2] Amann, R.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H. (1995). 'Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation'. Microbiol Rev. 59 (1), 143-69.
- [3] American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environmental Federation (1998). 'Standard methods for the examination of water and wastewater'. 20th edition. Washington D.C.
- [4] Eikelboom, D.H. (2000). 'Process control of activated sludge plants by microscopic investigation'. London, U.K.; IWA Publishing, London.
- [5] Jenkins, D.; Richard, M.G.; Daigger, G.T. (2004). 'Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming'. 3th Edition. Lewis publishers (Michigan).
- [6] Kanagawa, T.; Kamagata, Y.; Shinobu, A.; Kohno, T.; Horn, M.; Wagner, M. (2000). 'Phylogenetic analysis of and oligonucleotide probe development for *Eikelboom* type 021N filamentous bacteria isolated from bulking activated sludge'. Appl. Environ. Microbiol. 66, 5.043-5.052.
- [7] Martins, A.M.P.; Pagill, K.; Heijnen, J.J.; Van Loosdrecht, M.C.M. (2004). 'Filamentous bulking sludge - a critical review'. Wat. Res. 38, 793-817.
- [8] Palm, J.C.; Jenkins, D.; Parker, D.S. (1980). 'Relationship between organic loading, dissolved oxygen concentration and sludge settleability in the completely mixed activated sludge process'. J. Water Polln Control Fedn. 52, 2.484-506.
- [9] Pujol, R.; Vachon, A.; Martin, G. (1990). 'Technical manual for activated sludge monitoring (Guide technique sur le foisonnement des boues activées)'. Document technique, FNDAAE N° 8.
- [10] Ramírez, G.W.; Alonso, J.L.; Villanueva, A.; Guardino, R.; Basiero, J.A.; Bernacer, I.; Morenilla, J.J. (2000). 'A rapid, direct method for assessing chlorine effect on filamentous bacteria in activated sludge'. Wat. Res. 34, 3.894-3.898.
- [11] Seviour, E.M.; Blackall, L.L.; Christensson, C.; Hugenholz, P.; Cunningham, M.A.; Bradford, D.; Stratton, H.M.; Seviour, R.J. (1997). 'The filamentous morphotype *Eikelboom* type 1863 is not a single genetic entity'. J. Appl. Microb. 82: 411-21.