

¹Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente, (IIAMA). Universidad Politécnica de Valencia, 46022 (e-mail: jalonso@ihrd.upv.es).

²Departamento de Ingeniería Química. Universitat de València, Burjassot, 46100 Valencia (Luis.Borras-Falomir@uv.es)

³Grupo Aguas de Valencia. EDAR Quart Benager, EPSAR, 46014 Valencia (e-mail: azornoza@aguasdevalencia.es).

⁴Aula de Bioindicación y Control de Proceso en EDAR (Grupo Bioindicación Sevilla, IIAMA) (web: www.aula-bioindicacion.blogspot.com).

INTRODUCCIÓN

Todas las bacterias nitrificantes son de crecimiento lento y sensibles a cambios en las condiciones de crecimiento. En consecuencia, se producen a menudo problemas en la nitrificación en las EDAR por alteraciones no previstas. Las causas de estas alteraciones no son del todo conocidas en muchos casos. Si se produce un descenso en la población de bacterias oxidadoras de amonio a nitrato (AOB) y bacterias oxidadoras de nitrito a nitrato (NOB) y se detecta rápidamente, se pueden tomar medidas desde el punto de vista operacional para prevenir el peor de los escenarios posibles. La recuperación de las poblaciones de nitrificantes es lenta después de un proceso de ruptura de la nitrificación. Estas rupturas son producidas ocasionalmente, por ejemplo, por cambios en la T³, carga másica, edad de fango, oxígeno, pH o tóxicos metálicos. Estas rupturas son más evidentes en EDAR que tratan aguas residuales industriales, mientras que en las EDAR que tratan aguas residuales domésticas no hay una correlación clara entre el rendimiento de la nitrificación y las condiciones ambientales. La técnica más adecuada para la identificación de AOB y NOB es la hibridación *in situ* con sondas ADN:RNA marcadas con fluorocromos (FISH). En la mayoría de EDAR el amonio es oxidado por bacterias del género *Nitrosomonas* (incluido *Nitrosococcus mobilis*). Los grupos que dominan los diferentes sistemas de tratamiento de aguas residuales domésticas son las beta-proteobacterias oxidadoras de amonio a nitrato, que comprende los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrospira*, y las oxidadoras de nitrito a nitrato de los géneros *Nitrobacter* y *Nitrospira*. Diferencias locales en las concentraciones de sustratos (micronichos) dentro de los flocúlos pueden afectar a la distribución y actividad de las AOB en las EDAR. La combinación de la técnica FISH y el software de cuantificación permiten la cuantificación de las poblaciones de AOB y NOB. Se van a utilizar estas dos técnicas para hacer el seguimiento de las bacterias nitrificantes en una EDAR que trata aguas residuales domésticas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreos: Se han tomado 24 muestras simples de licor mezcla, con una frecuencia quincenal, durante el año 2009 de una depuradora de la Comunidad Valenciana (QB) de 249.000 h.e. El proceso biológico se basa en un diseño AO, con un selector anóxico compartimentado dentro de la unidad del reactor biológico de geometría rectangular (75 x 20 x 4,50 m).

Técnica FISH: En la técnica de hibridación se ha seguido el protocolo de Nielsen (2009), las sondas que se han utilizado con la técnica FISH para la identificación y cuantificación de las bacterias del dominio Bacteria, nitrificantes AOB y NOB presentes en las muestras de fangos activos se describen en la Tabla 1. Las hibridaciones se han realizado a 46 °C durante 2h.

Cuantificación: Las células hibridadas se han cuantificado a partir de imágenes capturadas con un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX 50) y una cámara digital (Olympus DP 12). Para la cuantificación de la señal de cada una de las sondas y muestra se han tomado un mínimo de 20 campos microscópicos seleccionados al azar utilizando el programa Matlab. Se ha determinado el valor umbral óptimo para cada 1 de las imágenes capturadas. El área, en píxeles, de la señal de la sonda específica (AOB, NOB)-fluorocromo se expresó como porcentaje medio del área ocupada por la señal de hibridación de la sonda EUB mix. El error de la cuantificación se calculó dividiendo la desviación estándar por la raíz cuadrada de "n", donde n es el número de campos examinados (Borrás, 2008) (figura 1).

Tabla 1. Sondas utilizadas para identificar las bacterias nitrificantes AOB y NOB.

| Sonda | Secuencia (5'-3') | Especificidad | % F ¹ | Referencia |
|-------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------|------------------------------|
| EUB 338 I | GCTGCCTCCCGTAGGAGT | Bacteria | | Amann (1990) |
| EUB 338 II | GCAGCCACCGTAGGTGT | Planctomycetes | | Daims <i>et al.</i> (1999) |
| EUB 338 III | GCTGCCACCGTAGGTGT | Verruimicrobiales | | Daims <i>et al.</i> (1999) |
| Nso1225 | CGCCATTGTATTACGTGTGA ² | β Proteobacteria ³ | 45 | Mobarry <i>et al.</i> (1996) |
| Ntspa662 | GGAATTCGCGCTCCTCT | <i>Nitrospira</i> spp. | 35 | Daims <i>et al.</i> (2001) |
| CNtspa662 | GGAATTCGCGCTCCTCT | Competidora ⁴ | | Daims <i>et al.</i> (2001) |
| NIT3 | CCTGTGCTCCATGCTCCG | <i>Nitrobacter</i> spp. | 40 | Wagner <i>et al.</i> (1996) |
| CNIT3 | CCTGTGCTCCAGGCTCCG | Competidora ⁴ | | Wagner <i>et al.</i> (1996) |

¹FA: Porcentaje de formamida; ²Modificada con 4 bases LNA (Alonso *et al.* 2009); ³AOB; ⁴Sin marcar para aumentar la especificidad de la sonda correspondiente Ntspa662 o NIT3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las AOB dominantes en las muestras analizadas han correspondido a la subclase beta-proteobacteria (figuras 2 y 3). Las bacterias NOB dominantes detectadas en la muestra de la EDAR QB pertenecen al género *Nitrospira* (figura 4). Todas las *Nitrospira* son de crecimiento lento y son muy difíciles de cultivar en el laboratorio. Todas las *Nitrospira* conocidas en EDARs forman agregados celulares esféricos o irregulares, formados por varios cientos a miles de células. El diámetro de estos agregados es de 10-100 μ m, aunque agregados más grandes se han encontrado ocasionalmente. En contraste con *Nitrospira* el género *Nitrobacter* parece jugar un papel menor en las EDARs. La presencia de *Nitrobacter* en las muestras analizadas ha sido ocasional (figura 5). En reactores que temporalmente contienen elevadas concentraciones de nitritos, por ejemplo SBR las concentraciones de *Nitrobacter* pueden ser elevadas, probablemente porque estas NOB están mejor adaptadas a concentraciones altas de nitritos, mientras que *Nitrospira* está adaptada a concentraciones bajas de nitritos y de oxígeno. Las NOB a menudo se encuentran relacionadas espacialmente con las AOB, lo que refleja la relación simbiótica mutualista de estos dos grupos funcionales.

La combinación de la técnica FISH y el software de cuantificación permiten la cuantificación de las poblaciones de AOB y NOB, y seguir la evolución de estas poblaciones en función de los parámetros operacionales y físico-químicos presentes en el reactor biológico. En la figura 6 se representan algunos parámetros que afectan al proceso de nitrificación (carga másica y T³). En los muestreos 12-18 se aprecia el efecto positivo de la T³ (>22 °C) sobre el proceso de nitrificación. Este puede verse favorecido incluso a temperaturas bajas (14 °C) con cargas másicas débiles (muestra 23). Las cargas elevadas afectan a la proceso (muestras 7,8,9 y 11).

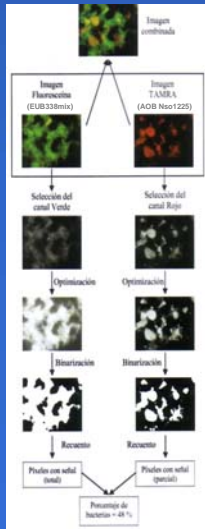


Figura 1. Flujo de procesos para la cuantificación.

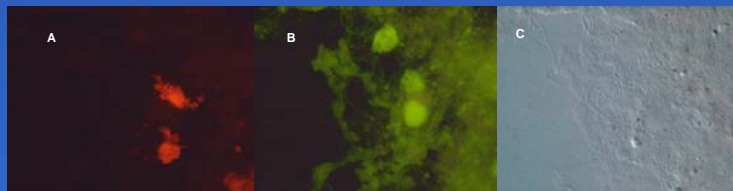


Figura 2: A) AOB sonda Nso 1225, B) Mismo campo sondas EUB338 mix, C) mismo campo DIC, 600X

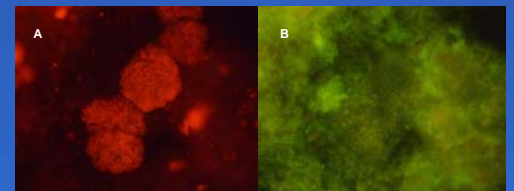


Figura 3: A) AOB sonda Nso 1225, B) Mismo campo sondas EUB338 mix, 600X

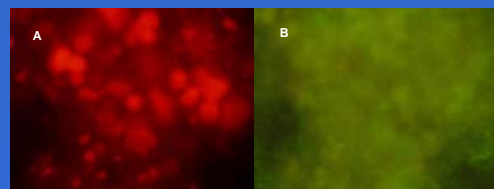


Figura 4: A) NOB, *Nitrospira* spp. sonda Ntspa662, B) Mismo campo sondas EUB338 mix, 600X

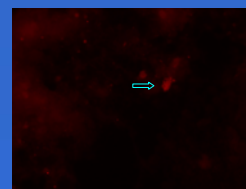


Figura 5. NOB, *Nitrobacter* spp. Sonda NIT3, 600X

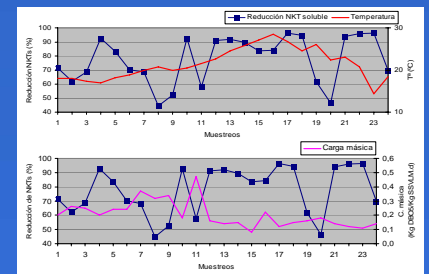


Figura 6. Reducción del NTKs frente a la temperatura y carga másica