

Resumen

La concentración y la actividad de la biomasa son dos parámetros de gran importancia para el diseño y control de los procesos biológicos. En la depuración biológica de aguas residuales, la determinación del peso seco es una medida muy usada para la caracterización de la biomasa. Sin embargo, este parámetro no es suficiente para describir la actividad biológica. Son necesarios, por tanto, otros métodos analíticos para una mayor comprensión del estado fisiológico de la biomasa. En este trabajo se realiza una revisión de los métodos más comunes aplicados al tratamiento biológico de aguas residuales, así como de las técnicas analíticas más avanzadas.

Palabras clave:

Actividad biológica, concentración de biomasa, depuración biológica, métodos de determinación de la biomasa, tratamiento de aguas residuales.

Abstract

Determining biomass in biological processes.

Methods for wastewater biological treatment.

Biomass concentration and activity are two important parameters for the successful design and control of biological processes in wastewater treatment. Widely used parameter for biomass characterization is dry weight concentration. This parameter is, however, not sufficient to describe biomass activity. Improved analytical methods are needed in order to understand the physiological behaviour of the biomass. In this work, conventional and advanced analytical methods for biomass determination in wastewater treatment are reviewed.

Keywords:

Biological processes, biomass activity, biomass concentration, methods for biomass determination, wastewater treatment

Determinación de la biomasa en procesos biológicos

II. Métodos aplicados al tratamiento biológico de aguas residuales

Por: **Carmen Arnáiz, Laura Isac y Julián Lebrato**

Grupo de Tratamiento de Aguas Residuales. Escuela Universitaria Politécnica. Universidad de Sevilla. C/ Virgen de África 7. 41011 Sevilla.
Tel. / Fax: 954 55 28 48 / 954 28 27 77. E-mail: lebrato@cica.es

1. Introducción

El desarrollo en las últimas décadas de los tratamientos biológicos de aguas residuales se ha centrado, fundamentalmente, en los procesos y no en la naturaleza, función y ecología de los microorganismos que intervienen en ellos. Para desarrollar procesos novedosos de biorremediación es necesaria la colaboración entre ingenieros y biólogos, y es importante que esta colaboración no se vea mermada por la diferencia en los objetivos y métodos característicos de cada especialidad (Andrews, 1994). Desde este punto de vista, es necesario un mejor conocimiento de la microbiología de las aguas residuales para optimizar el diseño y la explotación de los procesos biológicos de depuración.

La concentración de la biomasa es uno de los parámetros fundamentales en el diseño y control de los tratamientos de depuración basados en cultivos biológicos en suspensión. Así, por ejemplo, el tiempo de retención celular (TRC), la carga orgánica y los volúmenes de recircu-

lación y de fangos en exceso están íntimamente relacionados con la cantidad de microorganismos.

En los tratamientos de depuración que utilizan cultivos biológicos fijos, la carga orgánica se expresa normalmente como una función del volumen del material de soporte o de su superficie específica. De esta forma, el reactante principal del proceso no tiene la relevancia que debería tener. Esto se debe, principalmente, a que la mayoría de los métodos de estimación de biomasa se han desarrollado para cultivos en suspensión y su adaptación a cultivos fijos lleva implícita la separación de la biopelícula del soporte. El procedimiento de extracción se convierte, por tanto, en un paso limitante ya que puede provocar lisis celular o cambios fisiológicos rápidos, que afecten a la medida de la biomasa. Esta problemática a la hora de estimar la biomasa de un cultivo fijo hace que, en la mayoría de los casos, un material de soporte sea caracterizado y seleccionado en términos de desaparición de sustrato, superficie

Tabla 1

Algunos estudios de estimación de biomasa en depuración de aguas residuales.

Autores	Método	Estudio
Roe et al., 1982	ATP	Fangos activos
Morgan et al., 1991	MEF, MV, NMP, recuento en placa	Contacto, filtro, UASB y lecho fluidizado anaerobios
Gikas y Livingston 1993	ATP, MV	CSTR y lecho fluidizado aerobio
Urbain et al., 1993	PS	Biofloculación en fangos activados
Kim et al., 1994	DHA	Efecto del Cl ₂ y H ₂ O ₂ sobre bacterias filamentosas en fangos activados
Pierzo et al., 1994	MEF	Localización y recuento de bacterias activas en cultivos suspendidos y fijos
Tavares, et al., 1994	PS, PT anaerobio	Colonización de soportes en lecho fluidizado
Zhang y Bishop, 1994	DHA, LP, MV, NMP, recuento en placa	Estructura, actividad y composición de biopelículas aerobias
Cao y Alaerts, 1995	COT, MV, SOUR	Biomasa suspendida y fijada en diversas condiciones hidrodinámicas
Teske et al., 1995	RNA	Competencia interespecífica en biopelículas anaerobias
Coello, 1996	DHA, MV, SOUR, recuento en placa	Fangos activos
Tay et al., 1996	BMP	Filtro anaerobio
Borja et al., 1997	MV	CSTR anaerobio
Gschlöbl et al., 1997	Actividades fosfatasa y peptidasa	Biopelículas desnitrificantes
Ince et al., 1997	MEF, NMP	Contacto anaerobio
Pollard y Greenfield, 1997	DNA, MEF	Fangos activados
Prakash y Kennedy, 1997	DQO, MV	Lecho fluidizado anaerobio
Raunkjaer et al., 1997	MV, DQO, PS, PT	Biopelículas aerobias procedentes de colectores
Arnáiz et al., 1998	LP, MV	Colonización de soportes
García et al., 1998	MV	Lecho fluidizado inverso anaerobio
Otal, 1998	BMP, DO, MV	Tratamiento químico-biológico, CSTR aerobio y anaerobio
Arnáiz et al., 1999a	Recuento en cámara	Filamentos en fangos activados
Arnáiz et al., 1999b	LP, MV	Digestión anaerobia de fangos urbanos
Ruiz et al., 2000	MV	SBR anaerobio

BMP, potencial bioquímico de producción de metano. CSTR, continuous stirred tank reactor. DHA, actividad deshidrogenasa. DO, densidad óptica. LP, fosfolípidos. MEF, microscopía de epifluorescencia. MV, materia volátil. NMP, número más probable. PS, polisacáridos. PT, proteínas totales. SBR, sequencing batch reactor. SOUR, tasa de respiración específica. UASB, upflow anaerobic sludge blanket.

específica, rugosidad u otras características físicoquímicas y no por la capacidad de retención de biomasa.

A continuación se describen los principales métodos de determinación de la biomasa aplicados a la depuración biológica de aguas resi-

duales. Se presentan clasificados en tres categorías principales: determinación de la cantidad total, de algún componente celular específico y de la actividad biológica. Algunos de estos estudios aparecen recogidos en la **Tabla 1**.

2. Determinación de la cantidad total de biomasa

El método más extendido de determinación de la biomasa, en cultivos en suspensión y fijos que eliminan materia orgánica y nutrientes de aguas residuales urbanas e indus-

triales, es la determinación de la materia volátil libremente suspendida o adherida a un material de soporte (Borja et al., 1997; García et al., 1998; Ruiz et al., 2000). La principal desventaja de este método es que su determinación incluye no sólo microorganismos activos sino microorganismos muertos, material inerte, polímeros extracelulares y materia orgánica adsorbida.

Entre los métodos de estimación de la biomasa en continuo en tratamiento de aguas residuales podemos destacar los medidores de sólidos en suspensión. Presentan el inconveniente de que tienen que ser limpiados y calibrados al menos una vez al día.

Otra aproximación directa a la biomasa consiste en el empleo de técnicas de espectrofotometría. En la literatura aparecen mencionadas principalmente para la cuantificación de biomasa libremente suspendida. Presentan muchos problemas en sistemas biológicos de depuración ya que éstos son normalmente cultivos mixtos, lo que lleva implícito problemas de calibración. Suelen ser más utilizados cuando el influente tiene un número discreto de sustratos muy específicos, típicamente aguas residuales industriales, lo que lleva en la práctica a la selección de cultivos biológicos casi puros (Otal, 1998).

Las medidas físicoquímicas (COT y DQO) de la biomasa total libre o fijada son bastante imprecisas ya que no representan el contenido real de bacterias sin los polímeros extracelulares. Esta limitación es especialmente importante en el caso de biopelículas en las que el material extracelular puede llegar a constituir el 80% de la materia orgánica (Nelson et al., 1996). Aquellos autores que utilizan el contenido en carbono para expresar la biomasa lo multiplican por un factor de 2, ya que el COT representa aproximadamente el 50% de la biomasa celular (Cao y Alaerts, 1995). En el caso de utilizar la DQO, se suele emplear el factor

0,706 g SSV.g-1 DQO (Prakash y Kennedy, 1997).

El recuento directo de bacterias en cámaras no es frecuente en tratamientos de depuración de aguas por el número de réplicas necesario para una medida significativa estadísticamente y por la dificultad de distinguir las bacterias de las frecuentes partículas en suspensión. No obstante, en el caso de procesos en los que las bacterias filamentosas sean abundantes, es necesario estimarlas por separado. Este es el caso de los procesos de fangos activados con problemas de esponjamiento (bulking) o espumas (foaming), en los que es frecuente el empleo de cámaras de recuento (Arnáiz et al., 1999a).

Desde los años 70, la microscopía de epifluorescencia es la técnica más frecuente para la enumeración directa de bacterias. En procesos de depuración de aguas residuales se utiliza para la estimación del número total de bacterias (Morgan et al., 1991; Ince et al., 1997; Pollard y Greenfield, 1997) y el número de bacterias activas (Pierzo et al., 1994). La epifluorescencia es un método simple y rápido. No obstante, la reproducibilidad de estos métodos está cuestionada y necesitan un equipamiento relativamente caro.

Los métodos de enumeración de bacterias mediante siembras son también bastante frecuentes en procesos de depuración de aguas residuales. Los más extendidos son el recuento en placa (Morgan et al., 1991; Zhang y Bishop, 1994; Coello, 1996) y la estimación del número más probable (Morgan et al., 1991; Ince et al., 1997). Resulta sorprendente el uso extensivo de este tipo de métodos (sobre todo en Sanidad Pública) dada la enorme limitación que presentan: sólo estiman las células viables, es decir, las que conservan la capacidad de reproducirse en un medio y condiciones de incubación muy concretos. No estiman las células no viables, es decir, aquéllas que no pueden reproducir-

*El recuento directo
de bacterias
en cámaras
no es frecuente*

se debido a daños en el material genético pero que pueden utilizar sustratos, o aquéllas que pueden crecer en otras condiciones. Hutton (1974) calculó que la viabilidad de un fango activo de una E.D.A.R. urbana era de 20% y sólo del 2,5 al 5% en un fango activo de aguas industriales. Roe et al., (1982) calcularon viabilidades del 15 al 20% en fangos activos con altos TRC. Gikas y Livingston (1993) estimaron que la viabilidad de un cultivo fijo en un lecho trifásico aerobio era del 3 al 7%.

2. Determinación de componentes celulares específicos

La medida de alguno de los componentes celulares se ha usado ampliamente en Ecología Microbiana y ha despertado recientemente gran interés en el tratamiento de aguas residuales:

- determinación in situ de ácidos nucleicos (Teske et al., 1995) o tras su extracción (Pollard y Greenfield, 1997)
- determinación de la cantidad de proteína total (Tavares, et al., 1994; Raunkjaer et al., 1997)
- determinación de polisacáridos totales (Tavares, et al., 1994; Raunkjaer, et al., 1997) y exopolisacáridos (Urbain et al., 1993), tanto para cuantificar biomasa como para explicar su contribución a la biofloculación y a la formación de biopelículas

- determinación de fosfolípidos (Zhang y Bishop, 1994; Arnáiz et al., 1998 y 1999b)
- determinación de ATP (Roe et al., 1982; Gikas y Livingston, 1993).

4. Determinación de la actividad biológica de un cultivo

En muchas ocasiones, la determinación de la biomasa total o de algún componente celular se complementa con la medida de alguna actividad cinética o metabólica del cultivo biológico. Son muchas las técnicas empleadas en tratamiento de aguas residuales. Sin duda la más usada es la cinética de desaparición de sustrato, pero se está imponiendo cada vez más la medida de la actividad de alguna enzima, (Kim et al., 1994; Coello, 1996; Gschlöbl et al., 1997), la tasa de consumo específico de oxígeno (Kim et al., 1994; Cao y Alaerts, 1995) y la producción de gases (Tay et al., 1996; Otal, 1998).

En los trabajos anteriormente mencionados, uno de los parámetros clave es la determinación de la actividad de la biomasa en términos de desaparición de sustrato. Sin embargo, este parámetro no siempre puede correlacionarse con el descriptor convencional de la biomasa, la materia volátil en suspensión o adherida a un material de soporte. Esta divergencia es aún más marcada en sistemas con biopelículas, en las que la matriz extracelular, constituida fundamentalmente de exopolisacáridos, es una componente muy importante. A priori puede parecer claro que en un sistema en el que la materia orgánica es degradada única y exclusivamente por la acción de microorganismos, las velocidades de desaparición de sustrato y de crecimiento o producción de microorganismos deben estar profundamente relacionados. Sin embargo, diversos factores hacen que la relación entre ambas velocidades no sea proporcional: los microorganismos no pueden considerarse co-

mo reactores químicos ya que presentan la capacidad de adaptación, por lo que pueden producirse desplazamientos poblacionales. Este aspecto puede ser muy importante en el caso de la depuración biológica de aguas residuales industriales, en las que sustratos muy específicos pueden seleccionar grupos bacterianos muy específicos, cada vez más activos.

Todos los métodos descritos tienen limitaciones ya sea en complejidad, tiempo necesario para su realización, costes económicos, reproducibilidad y sensibilidad. No obstante, son varios los autores que recomiendan el contenido de fosfolípidos como uno de los ensayos más precisos y sencillos de estimación de la biomasa viva, viable o no viable, de un proceso biológico.

La mayoría de los estudios sobre la biomasa en tratamiento de aguas residuales se limitan a caracterizar un proceso concreto con alguno de los métodos indicados. Son pocos los trabajos en los que diversos procesos son caracterizados con el mismo procedimiento por lo que, a pesar del gran volumen de datos, se han generado pocos principios básicos y generales. Esto implica, evidentemente, limitaciones a la hora de optimizar estos procesos en su aplicación industrial.

5. Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Dirección General de Investigación Científica y Técnica, Ministerio de Educación y Cultura, por la financiación de parte de este trabajo mediante dos becas del Programa de Formación de Personal Investigador, Refs.: IN92-D28480461 y IN92-D28598661 concedidas a M.C. Arnáiz y L. Isac, respectivamente.

6. Bibliografía

Andrews, G.F. (1994). Hazardous organic waste amenable to biological treatment. En *Biotechno-*

logy for the Treatment of Hazardous Waste. D.L. Stoner (Ed.). Chelsea, MI. Lewis Publishers.

Arnáiz, M.C., Ruiz, C., Gómez, E., García, I., Escot, E., Aguilar, E., Medialdea, J.M., Gutiérrez, J.C. y Lebrato, J. (1998). Evaluation of the efficacy of materials as anaerobic wastewater treatment supports by phospholipid analysis. *Proc. Int. Specialty Conf. on Microbial Ecology of Biofilms: Concepts, Tools and Applications*. Chicago.

Arnáiz, M.C., Jiménez, C. y Estévez, F. (1999a). Determinación rápida de microorganismos filamentosos en fangos activos. *Tecnología del Agua* 193, 102-107.

Arnáiz, M.C., Ruiz, C., Medialdea, J.M., Gutiérrez, J.C. y Lebrato, J. (1999b). Effects of sludge type on biomass in anaerobic digestion of liquid sludges from municipal wastewater treatment plants. *Proc. 2nd Int. Symp. on Anaerobic Digestion of Solid Waste*. Barcelona.

Borja, R., Sánchez, E., Martín, A. y Jiménez, A.M. (1992). Kinetic behaviour of waste tyre rubber as microorganisms support in an anaerobic digester treating cane molasses distillery slops. *Bioprocess Eng.*, 16, 17-23.

Cao, W.S. y Alaerts G.J. (1995). Influence of reactor type and shear stress on aerobic biofilm morphology, population and kinetics. *Wat. Res.*, 29, 107-118.

Coello, M.D. (1996). Determinación de la actividad de los lodos de una planta de tratamiento de aguas residuales. *Tesina de Licenciatura*, Universidad de Cádiz.

García, D., Buffière, P., Elmaleh, S. y Moletta, R. (1998). Application of the down-flow fluidized bed to the anaerobic treatment of wine distillery. *Wat. Sci. Tech.*, 38(8-9), 393-399.

Gikas, P. y Livingston, A.G. (1993). Use of ATP to characterize biomass viability in freely suspended and immobilized cell biore-

- actors. *Biotechnol. Bioeng.*, 42, 1337-1351.
- Gschlöbl, T., Michel, I., Heiter, M., Nerger, C. y Rehbein, V. (1997). Microscopic and enzymatic investigations on biofilms of wastewater treatment systems. *Wat. Sci. Tech.*, 36(1), 21-30.
- Hutton, D.G. (1974). Biomass determination and their relationship to the kinetics of the activated sludge process. *AIChE Symp. Series* 70, 91-100.
- Ince, O., Anderson, G.K. y Kasapgil, B. (1997). Composition of the microbial population in a membrane anaerobic reactor system during start-up. *Wat. Res.*, 31, 1-10.
- Kim, C., Koopman, B. Y Bitton, G. (1994). INT-dehydrogenase activity test for assessing chlorine and hydrogen peroxide inhibition of filamentous pure cultures and activated sludge. *Wat. Res.*, 28, 1117-1121.
- Morgan, J.W., Evison, L.M. y Forster, C.F. (1991). Changes to the microbial ecology in anaerobic digesters treating ice cream wastewater during start-up. *Wat. Res.*, 25, 639-653.
- Nelson, Y.M., Lion, L.W., Shuler, M.L. y Ghiorse, W.C. (1996). Modeling oligotrophic biofilm formation and lead adsorption to biofilm components. *Environ. Sci. Technol.*, 30, 2027.
- Otal, E. (1998). Tratamiento químico-biológico integrado de compuestos difícilmente biodegradables. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.
- Pierzo, V., Bellahcen, D., Fontvieille, D., Lazarova, V., Huyard, A. y Manem, J. (1994). Improved procedure for wastewater biofilm removal and analysis. *Coll. Surf. B: Biointerfaces* 2, 577-584.
- Pollard, P.C. y Greenfield, P.F. (1997). Measuring in situ bacterial growth rates and population dynamics in wastewater. *Wat. Res.*, 31, 1074-1082.
- Prakash, R. y Kennedy, K.J. (1997). Kinetics of an anaerobic fluidized bed reactor using biolite carrier. *Can. J. Civ. Eng.*, 23, 1305-1315.
- Raunkjaer, K., Nielsen, P.H. y Hvitved-Jacobsen, T. (1997). Acetate removal in sewer biofilms under aerobic conditions. *Wat. Res.*, 31, 2727-2736.
- Roe, P.C., Surinder, J. y Bhagat, K. (1982). Adenosine triphosphate as a control parameter for activated sludge processes. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 54, 244-254.
- Ruiz, C., Torrijos, M., Joyard, O., Lebrato, J. y Moletta, R. (2000). The anaerobic SBR process: basic principles for desing and automatization. *Wat. Sci. Tech.*, (en prensa).
- Tavares, C.R.G., Russo, C. y Sant'Anna, G.L. (1994). Aerobic treatment of wastewaters in a three-phase fluidized-bed bioreactor: a comparison of two types of polymeric supports. *Environ. Technol.*, 15, 687-693.
- Tay, J.H., Show, K.Y. y Jeyaseelan, S. (1996). Effects of media characteristics on performance of upflow anaerobic packed-bed reactors. *J. Environ. Eng.*, 122, 469-476.
- Teske, A.E., Alm, E., Regan, J.M., Toze, S., Rittmann, B.E. y Stahl, D.A. (1994). Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *J. Bacteriol.*, 176, 6623-6630.
- Urbain, V., Manem, J. Y Block, J.C. (1993). Bioflocculation in activated sludge: an analytical approach. *Wat. Res.*, 27, 829-838.
- Zhang, T.C. y Bishop, P.L. (1994). Structure, activity, and composition of biofilms. *Wat. Sci. Tech.*, 29(7), 335-344.

Directorio del Agua

2000



El Directorio contiene información detallada sobre las empresas con:

Dirección, Tel., Fax, E-mail, Director Comercial, Director Técnico, Director General, Nº de Empleados, Cifra de ventas, Carácter de la Sociedad, NIF, Marcas, Productos, Distribuidores, Delegaciones, etc...

Contiene:

- Índice de sectores, actividades y productos.
- Clasificación de empresas por productos.
- Relación alfabética de empresas.
- Índice de marcas.
- Otras direcciones de interés: asociaciones, cámaras del comercio...
- Agenda internacional de ferias y congresos.