

**Resumen**

Existen muchos métodos para la estimación de la biomasa de un bioproceso. Sin embargo, ésta puede resultar una tarea laboriosa, tediosa e impracticable. Las muestras que contienen organismos filamentosos, como los fangos activos de E.D.A.R.s, presentan especiales dificultades ya que puede ser necesario estimarlos por separado. En este trabajo se muestra un método de recuento de estos organismos sencillo y rápido. El objetivo es disponer de un método cuantitativo de estimación de microorganismos filamentosos para optimizar el uso del hipoclorito sódico en sistemas de fangos activos con problemas de esponjamiento o espumas.

**Palabras clave:**

Depuración biológica Aguas residuales, Fangos activos, Microorganismos filamentosos, Estimación de la biomasa, Técnica recuento.

**Abstract****Rapide determination of filamentous microorganisms in activated sludge.**

Despite many methods available, biomass estimation of a bioprocess may sometimes become laborious and impracticable. Samples containing filamentous organisms, as in Wastewater Treatment Plants, present special counting difficulties. If they are abundant they may need to be estimated separately. In this work a counting method for these organisms is shown. The main goal is to improve chlorination of activated sludge suffering bulking or foaming through a quantitative record of filamentous bacteria.

**Keywords:**

Biological treatment, Wastewaters, Activated sludge, Filamentous microorganisms, Biomass estimation, Counting.

# Determinación rápida de microorganismos filamentosos en fangos activados

Por: **Carmen Arnáiz** <sup>(1)</sup>, **Carmen Jiménez** <sup>(2)</sup> y **Fernando Estévez** <sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> Lda. CC. Biológicas. Técnico del Laboratorio de Aguas Residuales. Dpto. de Control de Calidad de la Empresa Municipal de Abastecimiento y Saneamiento de Aguas de Sevilla, EMASESA.

<sup>(2)</sup> Lda. CC. Químicas. Técnico del Laboratorio de Aguas Residuales. Dpto. de Control de Calidad de EMASESA. E.D.A.R. "La Ranilla". Bda. San José de Palmete. 41006-Sevilla. Teléfono/Fax: 954251151. E-mail: cjimenez@emasesa.com

<sup>(3)</sup> Jefe del Departamento de Aguas Residuales de EMASESA. C/ Escuelas Pías, 1. 41003-Sevilla.

Teléfono: 954590409. Fax: 954226511. E-mail: festevez@emasesa.com

**1. Introducción**

La evaluación de la biomasa es una de las variables más importantes de un bioproceso, ya que su determinación nos lleva a la comprensión de la eficiencia del mismo. Se trata de una variable clave para establecer las tasas de producción, de consumo de nutrientes y el cálculo de los balances de masa de cualquier proceso biológico. Por tanto, el disponer de un método preciso para su estimación, en tiempo real, es un objetivo primordial en la explotación de cualquier proceso biológico.

Existen numerosos métodos, directos e indirectos, para la estimación de biomasa ya sea utilizando técnicas físicas o bioquímicas. A pesar de estos interesantes y prometedores métodos, la evaluación de una población microbiana puede resultar frecuentemente una tarea laboriosa, tediosa e impracticable desde el punto de vista del tiempo requerido. Aquellas muestras que contienen microorganismos filamentosos presentan especiales dificultades ya que, si son abundantes,

es necesario estimarlos por separado. Este es el caso del sistema de fangos activos de una Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR).

El proceso de fangos activos es el tratamiento secundario más extendido en el mundo y se trata, sin duda, del corazón de una EDAR.

La biodiversidad que existe en el fango activo de una EDAR es alta (Taber, 1976; Pipes, 1978). Hoy en día, la mayor problemática detectada a este nivel estriba en el control de las bacterias filamentosas. Estos microorganismos cuando son dominantes causan un gran número de problemas, con un denominador común: pérdida de la calidad del agua tratada. En general, estos problemas están relacionados con un cambio en las características de sedimentación y compactación del fango biológico.

Los fenómenos de esponjamiento (*bulking*) o espumas (*foaming*) son dos grandes problemas que quedan aún por solucionar en el control del proceso de los tratamientos bio-

lógicos de aguas residuales. Por otra parte, cada vez con más asiduidad, los controles microbiológicos de los fangos activos se convierten en controles de rutina entre los realizados periódicamente en la línea de agua. Al mismo tiempo, se detecta la necesidad de que este tipo de controles sean lo más objetivos posibles (Polo & Salvadó, 1997).

Cuando estos problemas aparecen en una EDAR hay que recurrir en muchas ocasiones a sistemas correctivos de control, típicamente la cloración. La optimización económica del uso del hipoclorito sódico pasa indudablemente por un conocimiento objetivo de la cantidad de filamentos en el fango activo.

En la literatura científica existen diversas técnicas para el recuento de microorganismos filamentosos. Sin embargo, éstas suelen consumir bastante tiempo. Hay que tener en cuenta que si se desea utilizar cualquier técnica de recuento, como análisis rutinario, en la explotación de la planta de tratamiento, ésta además de ser fiable tiene que proporcionar resultados en tiempo real.

Las técnicas más antiguas eran semicuantitativas y en los últimos años se han desarrollado otras más precisas aunque, como se ha comentado antes, lentas de utilizar y, por tanto, incompatibles con la explotación diaria de la EDAR.

Sezgin et al. (1978) establecieron una técnica para medir la longitud total de los filamentos presentes en un fango activo. Usando una cámara de recuento, asignaban a los filamentos presentes diferentes categorías de longitud; los filamentos más largos se medían individualmente. Pipes (1979) utilizó la cámara de Neubauear para contar el número de filamentos. Giovanetti & Mosse (1980) utilizaron una cuadrícula marcada en cajas de Petri para el análisis cuantitativo de la infección por microrrizas en raíces.

Salvadó (1990) contaba el número de intersecciones con una circunferencia grabada en el ocular. Pro su parte, Fry (1990) indicó que

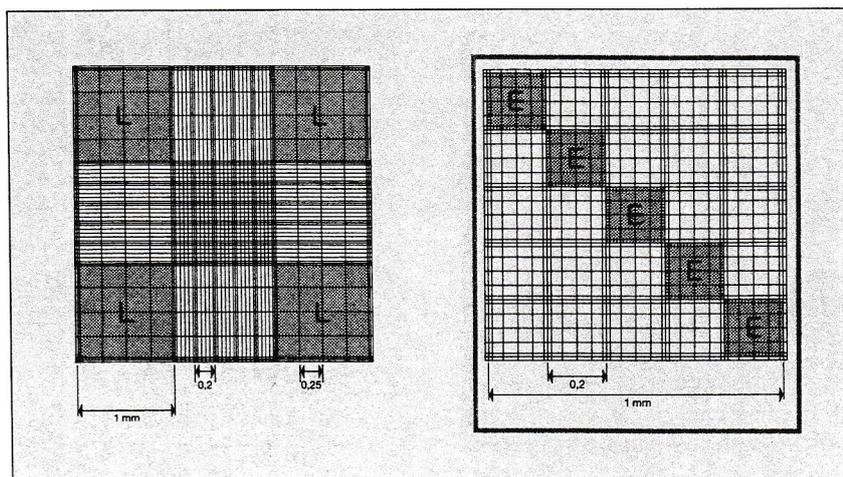


Fig. 1. Cámara de recuento Neubauer y detalle de la cuadrícula central.

el mejor método para estimar la longitud total de filamentos es el método de las intersecciones con las líneas de una cuadrícula. Pitt & Jenkins (1990) establecieron una técnica específica de recuento de filamentos *Nocardia sp.*, especialmente conocida por lo laboriosa y tediosa que resulta. El personal de la planta de tratamiento de San José/Santa Clara en California, empleaba una técnica simplificada de recuento de filamentos, ya que no se determinaba la longitud total de filamentos. Esta técnica aparece descrita en Jenkins et al. (1993). Se establecía el número de intersecciones de los filamentos con un segmento trazado en el ocular del microscopio. Estévez (1997) estableció el término "relación de filamentos", que es la suma del número de filamentos observados que interceptan con la circunferencia exterior del ocular.

En el presente trabajo se muestra una técnica de recuento de microorganismos filamentosos del fango activo, sencillo y compatible con la explotación de una EDAR al no consumir mucho tiempo. Esta técnica se basa en el método de las intersecciones con las líneas de una cuadrícula. La cuadrícula utilizada es la de la cámara de recuento Neubauer, más asequible que un ocular con una cuadrícula grabada. Sólo se cuentan las intersecciones con los

cuadrados de una de las diagonales centrales.

El objetivo perseguido es disponer de una técnica de recuento cuantitativa de bacterias filamentosas, para optimizar el uso del hipoclorito sódico en sistemas de fangos activos con problemas de esponjamiento de fangos (*bulking*) o espumas (*foaming*).

## 2. Métodos de Trabajo y Materiales

El microscopio óptico utilizado fue un Zeiss Axioplan 2 provisto de contraste de fases, oculares 10x y objetivos 10/20/40 y 100x. El cabezal dispone de una cámara fotográfica Zeiss MC 80 DX y vídeo cámara Sony CCD-IRIS.

Las observaciones se realizaron sobre muestras "in vivo", no prensadas ni teñidas (Salvadó, 1990; Estévez, 1997).

La cámara de recuento empleada fue Neubauer improved, cuadrícula doble (BRAND, Ref. 717820) (ver Figura 1). La profundidad de la cámara es de 0,1 mm. La cuadrícula de recuento muestra 9 cuadrados grandes, cada uno de 1 mm<sup>2</sup>. Los 4 cuadrados grandes de las esquinas señalados con una "L" están divididos en 16 cuadrados con 0,25 mm de lado. El cuadrado grande central está dividido en 25 cuadrados medianos con lados de 0,2 mm, estando cada cuadrado mediano subdividido en

*El recuento  
es rápido y  
no resulta  
cansado*

16 cuadrados pequeños con 0,05 mm de lado.

Se realizó el recuento de las intersecciones con una de las diagonales del cuadrado central que incluye 20 cuadrados pequeños dentro de los 5 cuadrados medianos señalados con una "E". Hay que decir que este diagonal se incluye prácticamente entera en el campo visual del microscopio, con lo que el recuento es rápido y no resulta cansado ni tedioso. Los recuentos fueron realizados con el objetivo de 20x, "in vivo" y con contraste de fases. Se contó el número de intersecciones con una de las diagonales del cuadrado central de los filamentos libres y aquellos que se extienden desde el flóculo ya sean rectos, ligeramente curvados, curvados o torcidos. También se contaron los que estaban en el interior de los flóculos y podían distinguirse entre la estructura flocular.

Una cámara de recuento frecuente en cualquier laboratorio de aguas residuales es la cámara de Fuchs-Rosenthal, utilizada en el recuento de pequeños flagelados para establecer el Índice Biótico del Fango Activo (SBI, *Sludge Biotic Index*), según Madoni (1994). La profundidad de la cámara es de 0,2 mm. La cuadrícula de recuento tiene 16 cuadrados grandes de 1 mm de lado. Cada cuadrado grande está subdividido en 16 cuadrados pequeños de 0,25 mm de lado. Se comprobó que el recorrido de la diagonal de esta cuadrícula es muy largo, con lo cual

Tabla 1

Número de intersecciones de filamentos con los cuadrados que conforman una de las diagonales del cuadrado central de la cámara de Neubauer. Cada valor es la media de 12 recuentos. Dada la abundancia de filamentos en la fase 2, el recuento se realizó en muestras diluidas (Factor de dilución=5)

Fecha	Fase 1 Nº intersecciones	Fase 2 Nº intersecciones
04/03/99	9,33	—
08/03/99	9,50	78,3
11/03/99	9,83	—
15/03/99	—	153
16/03/99	19,3	135
17/03/99	13,7	55,0
18/03/99	11,6	67,9
22/03/99	21,8	84,2
23/03/99	28,8	80,8

un solo recuento resulta cansado. Además, la profundidad de la cámara es el doble que la de la cámara de Neubauer, por lo que hay más planos que observar, dificultándose enormemente el recuento.

Las muestras para este estudio fueron recogidas de la EDAR. "La Ranilla" de Sevilla, instalación que explota la Empresa Municipal de Abastecimiento y Saneamiento de Aguas de Sevilla, S.A. (EMASESA).

Esta depuradora posee dos fases de tratamiento, con un caudal de diseño de 25.000 m<sup>3</sup>/d cada una. Durante el período de experimentación las condiciones de trabajo fueron las siguientes: carga másica de 0,83 y 0,22 kg DBO<sub>5</sub>/kg SSLM, respectivamente, y concentración media de oxígeno disuelto de 2,8 mg/l en la fase 1 y de 5,2 mg/l en la fase 2.

### 3. Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 1**.

En la fase 1, se observa que en los días 04/03/99, 08/03/99 y 11/03/99 el número de intersecciones es muy similar. La media de esos valores era 9,55 y la desviación estándar  $\pm$  0,25.

En esta primera fase las bacterias filamentosas dominantes eran bacterias libres (tipo 1863 y 0211), que conferían turbidez al clarificado. Las bacterias filamentosas en el interior del flóculo que proporcionan una red o "microesqueleto" en el que se adhieren las bacterias floculantes eran escasas (ausencia de macroestructura). Esto daba como resultado que muchos flóculos fueran de tamaño pequeño y débil consistencia. Este tipo de flóculo no decantaba bien y en el decantador secundario no se detectaba una interfase clara entre el fango decantado y el líquido sobrenadante, sino que ésta era difusa. Esta situación empeoró a partir del 26/02/99, cuando se detectó un gran vertido de detergentes, que provocó una importante defloculación (disgregación flocular) del fango activo. Además, durante los días citados anteriormente, la abundancia de filamentos fue escasa: criterio de abundancia algunos/comunes, categoría numérica 2/3, filamentos no en todos los flóculos con baja densidad (1-5/flóculos) (criterio cualitativo de abundancia de filamentos según Jenkins et al., 1993).

Dadas las características del flóculo en la fase 1, así como la escasa

densidad y diversidad de microorganismos, se procedió a la inoculación en esta fase con los fangos en exceso de la fase 2, los días 10/03/99 y 11/03/99 desde las 8.00 a las 14.00 horas, y el día 12/03/99 desde las 8.00 a las 17.00 horas. Se puede observar en la **Tabla 1**, que el número de intersecciones se triplicó tras esta inoculación. Esto nos indica que el método es suficientemente sensible para detectar cambios rápidos.

En la fase 2, se observó durante el período de estudio una gran abundancia de filamentos, categoría numérica 5: abundantes, filamentos en todos los flóculos con densidad alta (>20 filamentos/flóculo). Debido a esta abundancia de filamentos los flóculos tenían una estructura muy abierta, con frecuentes puentes interfloculares. Esto hacía que el IVF de esta cuba fuera alto (superior a 200 ml/g), es decir, estábamos ante una situación de bulking filamentoso. Vemos en la **Tabla 1**, que el número de intersecciones en la fase 2 era alto durante los días 08/03/99, 15/03/99 y 16/03/99. Se procedió a la cloración de la recirculación de esta cuba a mediodía del 16/03/99 con 18 l/h de hipoclorito sódico (150 g Cl<sub>2</sub>/l). La cloración continuó hasta la noche del 18/03/99. Se observa en la **Tabla 1** que el número de intersecciones disminuyó 2,5 veces al día siguiente del comienzo de la cloración. De nuevo, esto indica que esta técnica de recuento es capaz de detectar rápidamente cambios en la cantidad de filamentos. Una vez interrumpida la cloración, el número de intersecciones aumentó, si bien no se alcanzaron los niveles iniciales.

En la **Tabla 1** se muestran el número de intersecciones de filamentos con los cuadrados de una de las diagonales centrales de la cámara de recuento. No obstante, puede ser interesante expresar los resultados en metros de filamento por ml de licor mezcla. Para ello, se realizaron dos cálculos que relacionan la longitud total de filamentos extendidos

en un área dada con el número de veces que éstos interceptan con una cuadrícula situada en dicha área. El volumen de muestra es el contenido en el cuadrado grande central de la cámara de recuento utilizada, es decir, 0,1 µl.

Cálculo 1

$$L = \frac{n \times d \times F}{2 \times r \times 2 \times V}$$

Cálculo 2

$$L = \frac{n \times A \times F}{r \times 1 \times V}$$

Donde:

L = longitud total de filamentos (mm/µl ó m/ml)

n = número de intersecciones

r = número de recuentos

V = volumen de muestra (0,1 µl)

F = 10,5

d = diagonal del cuadrado grande central de la cámara de Neubauer (mm)

A = área del cuadrado grande central de la cámara de Neubauer (mm<sup>2</sup>)

l = Σ perímetros de los cuadrados pequeños de la diagonal (mm)

Si se sustituyen los valores fijos, únicamente se tendrá que multiplicar una constante por el número medio de intersecciones:

Cálculo 1

$$L \text{ (mm/µL; m/ml)} = \frac{n}{r} \times 37,12$$

Cálculo 2

$$L \text{ (mm/µL; m/ml)} = \frac{n}{r} \times 26,25$$

En el primer cálculo, se divide el número de intersecciones por 2 para obtener el número de tramos y se considera que la longitud media de tramo es la diagonal/2. Por último, se extrapola al número total de cuadrados pequeños del cuadrado grande central de la cámara de Neubauer (F=10,5). Es un cálculo intuitivo.

En el segundo cálculo, siguiendo a Giovannetti & Mosse (1980), se tiene en cuenta el área total observada, longitud total del transecto sobre el que se realiza el recuento (suma de los perímetros de los cuadrados pequeños) y se extrapola al número total de cuadrados pequeños del cuadrado grande central de la cámara de Neubauer (F=10.5). Es un cálculo matemático.

Los resultados aparecen en la **Tabla 2**.

Como se observa en la **Tabla 2**, ambos cálculos son bastante similares. Por tanto, podemos trabajar si desea con el primero que, como hemos dicho, es más intuitivo que matemático. De esta forma se podría hablar de "longitud media de filamentos/ml de licor mixto".

Esta técnica está implantada en el Laboratorio de Aguas Residuales de EMASESA como análisis de rutina en el estudio de la calidad de fangos activos.

### 3. Conclusiones

La técnica de recuento de bacterias filamentosas quedaría establecido como sigue:

- Agitar suavemente durante 2-3 minutos el licor mixto.
- Se coloca una gota sobre la cámara de Neubauer y se cuenta el número de intersecciones con cada uno de los lados de los 20 cuadrados pequeños que forman una de las diagonales del cuadrado central. Se realiza el recuento de la muestra "in vivo", no prensada ni teñida, a 200 aumentos, y con contraste de fases. Si el recuento resulta dificultoso por la abundancia de filamentos se diluye la muestra.
- Si se desea, expresar los resultados en m/ml mediante alguno de los cálculos mostrados en el apartado de resultados.

Esta técnica se ha mostrado útil desde el punto de vista de la explotación de la EDAR. De hecho, ha proporcionado información rápida sobre el aumento de la abundancia de filamentos, tras la inoculación de

## ARTICULOS TECNICOS

**Tabla 2**

Cantidad de filamentos, expresada como m/ml de licor mezcla según el método de cálculo 1 y 2

Fecha	Fase 1		Fase 2	
	Cálculo 1	Cálculo 2	Cálculo 1	Cálculo 2
04/03/99	346	245	—	—
08/03/99	353	249	2906	2056
11/03/99	365	258	—	—
15/03/99	—	—	5679	4016
16/03/99	716	507	5011	3544
17/03/99	509	360	2041	1444
18/03/99	431	305	2520	1782
22/03/99	809	572	3126	2210
23/03/99	1069	756	2999	2121

una de las fases de tratamiento, así como de la disminución de la cantidad de filamentos tras un proceso de cloración en otra.

Los datos expresados como "longitud media de filamentos/ml de licor mixto" parecen tener validez desde el punto de vista matemático, si bien son algo más intuitivos.

Con esta técnica, se puede contar el número de intersecciones de los filamentos libres y aquellos que se extienden desde el flóculo, ya sean rectos, ligeramente curvados, curvados, torcidos, o enrollados. También es posible contar los que estén en el interior de los flóculos y puedan distinguirse entre la estructura flocular.

El siguiente paso, sería establecer a partir de qué y hasta qué número de intersecciones (ó m/ml) por mg de SSVLM es recomendable la cloración.

### Agradecimientos

Deseamos dar las gracias al Grupo de Tratamiento de Aguas Residuales de la Escuela Universitaria Politécnica de Sevilla, que muy amablemente nos ha prestado su cámara de Neubauer para comenzar este estudio, y a EMASESA por las facilidades para la realización del presente trabajo.

### Bibliografía

- Estévez, F. (1997). Optimización del uso de hipoclorito sódico en problemas de esponjamiento. Microorganismos filamentosos en el fango activo, pp. 137-144. Publicación de la Empresa Municipal de Abastecimiento y Saneamiento de Aguas de Sevilla, S.A. (EMASESA). I.S.B.N. 84-923139-0-0.
- Fry, J.C. (1990). Direct methods and biomass estimation. *Methods in Microbiology* 22, 41.
- Giovannetti, M. & Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84, 489.
- Jenkins, D., Daigger, G.T. and Richard, M.G. (1993). *Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming*. 2nd Edition, Lewis Publishers Inc., Chelsea, MI. I.S.B.N. 0-87371-873-9.
- Madoni, P. (1994). A Sludge Biotic Index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis. *Water Research* 28, 67.
- Pipes, W.O. (1978). Microbiology of activated sludge bulking. *Advances in Applied Microbiology* 24, 85.
- Pipes, W.O. (1979). Bulking, deflocculation and pin-point floc. *Journal of Water Pollution and Control Federation* 51, 62.
- Pitt, P.A. & Jenkins, D. (1990). Causes and control of Nocardia in activated sludge. *Journal of Water Pollution and Control Federation* 62, 143.
- Polo, P & Salvadó, H. (1997). Problemas de bulking y foaming en la práctica diaria de una E.D.A.R. Microorganismos filamentosos en el fango activo, pp. 137-144. Publicación de la Empresa Municipal de Abastecimiento y Saneamiento de Aguas de Sevilla, S.A. (EMASESA). I.S.B.N. 84-923139-0-0.
- Salvadó, H. (1990). Método rápido para el control del bulking. *Tecnología del Agua* 67, 60.
- Sezgin, M. Palm, J.H. & Parker, D.S. (1978). A unified theory of filamentous activated sludge bulking. *Journal of Water Pollution and Control Federation* 50, 362.
- Taber, W.A. (1976). Wastewater microbiology. *Annual Reviews Microbiology* 30, 263.