

## IV-Castillo-Chile-1

# INFLUENCIA DE CAMBIOS EN LA OPERACIÓN DE UN SISTEMA DE LODOS ACTIVADOS A ESCALA DE LABORATORIO SOBRE LA ESTRUCTURA BACTERIANA DETERMINADA MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES.

### NOMBRE DE LOS AUTORES

**Gabriela Castillo<sup>(1)</sup>.**

Químico Farmacéutico, Universidad de Chile (1966).

Profesor Asociado, Depto. Ingeniería Civil, Facultad de Ciencias Físicas y

Matemáticas, Universidad de Chile. Especialidad Microbiología Ambiental y Ecotoxicología

**Carolina Urmeneta<sup>(2)</sup>.**

Tesista para optar al título de Ingeniero Civil Químico y Biotecnología, Universidad de Chile.

Aprobada con distinción máxima, Octubre 2005

**Cristina Dorador<sup>(3)</sup>.**

Licenciada en Biología, Universidad de Chile (2003). En la actualidad realiza su Doctorado en Ecología Microbiana en el Instituto de Limnología, Plön, Alemania.

**Pamela Muñoz<sup>(4)</sup>.**

Tesista para optar al título de Ingeniero Civil, Universidad de Chile. Aprobada con distinción máxima, Julio 2006

**Leandro Herrera<sup>(5)</sup>.**

PhD Ingeniero Bioquímico Universidad de Swansea, Gales, Inglaterra. Profesor Asociado, Depto. Ingeniería Química, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile. Especialidad en Diseño y Operación de Reactores

**Blanca Escobar<sup>(6)</sup>.**

Licenciada en Química Facultad de Ciencias, Universidad de Chile (1984). Profesor Asistente, Depto. Ingeniería Química y Biotecnología, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile. Especialidad Procesos de Biolixiviación

**Dirección (1):** Av. Blanco Encalada 2002-Santiago-Chile Provincia o Departamento - Tel.: (+56-2) 978-4496 - Fax: (+56-2) 689-4171- e-mail: [gcastilo@infq.uchile](mailto:gcastilo@infq.uchile)

## RESUMEN

El tratamiento de aguas residuales mediante de lodos activados es un sistema biológico complejo, dinámico, no homogéneo, cuyo desconocimiento de su biología se debe principalmente a la dificultad de cultivo de los microorganismos mediante metodologías convencionales. Se estima que entre el 85-99% de los componentes de las comunidades bacterianas de los lodos activados no han sido cultivadas o identificadas. En los últimos años, con el advenimiento de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se han desarrollado diversos métodos que permiten acceder a la diversidad genética de los microorganismos, sin necesidad de cultivo para su identificación. Estas metodologías han sido de gran importancia para conocer la riqueza y abundancia de los diferentes biotipos presentes en muestras ambientales. En el presente trabajo se presentan resultados sobre el uso de la técnica t-RFLP utilizando como marcador genético el gen 16S rRNA, aplicado a un sistema de lodos activados a escala de laboratorio, para la detección y predicción de problemas de operación, especialmente en la separación del efluente líquido y compactación de los sólidos. Se diseñaron dos reactores incluyendo su respectivo sedimentador de lodos, y se realizaron experiencias de operación bajo diferentes condiciones, determinando parámetros físicos, químicos y análisis de t-RFLP. Los resultados indicaron que la disminución de OD induce a la producción de bulking (lodos abultados). Los electroferogramas de t-RFLP confirmaron el fragmento de 196 pb como representativo de bulking. Mientras que por la disminución de la relación F/M (0,3 a 0,1), los electroferogramas mostraron un incremento del fragmento 33 pb, asociado a bulking. Se encuentran en desarrollo experiencias sobre variaciones en el tiempo de retención celular en el reactor, su influencia en la eficiencia del proceso y modificaciones de la diversidad bacteriana. Considerando que los fragmentos de 196 pb y 33 pb, coincidentemente, aumentan su frecuencia relativa días antes de la detección de bulking por los parámetros físico-químicos, se continúan estudios a fin de verificar si éstos, u otros fragmentos por aparecer, podrían ser utilizados para predecir problemas de operación, previo a su aparición.

**Palabras clave:** Lodos activados, bulking, t-RFLP, 16S rDNA, diversidad microbiana

**Investigación financiada por:** FONDECYT-CHILE PROYECTO 1940949

## INTRODUCCIÓN

Basado en la alta eficiencia de reducción de materia orgánica y menor requerimiento de superficie en las instalaciones, el tratamiento de lodos activados (LA) es uno de los sistemas biológicos universalmente más utilizados para la descontaminación de las aguas residuales. El diseño y tecnología de tratamiento han logrado un importante desarrollo, sin embargo, éste no ha sido acompañado por el conocimiento de la biología del sistema, la que en general provoca problemas de operación y eficiencia del proceso (Bitton, 2005). Los lodos activados son sistemas complejos, dinámicos, no homogéneos y el desconocimiento de su biología se debe principalmente a la dificultad de cultivo de los microorganismos mediante metodologías convencionales. Se estima que entre el 85-99% de los componentes de las comunidades bacterianas de los lodos activados no han sido cultivadas o identificadas (Kaewpipat K. & Grady Jr. 2002).

En los últimos años, con el advenimiento de técnicas moleculares como la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), se han desarrollado diversos métodos que permiten acceder directamente a la diversidad genética de los microorganismos, sin necesidad de su aislamiento como cultivo puro para su identificación (Amman et al, 1995). Estas metodologías han sido de gran importancia para conocer la riqueza y abundancia de los diferentes biotipos presentes en muestras ambientales. La capacidad de medir las variaciones que ocurren en la biota presente en un sistema de lodos activados, permite establecer condiciones de operación, tales como, tasa de retorno del lodo, tasa de aireación, relación entre nutrientes, contenido de elementos traza, etc.(Metcalf & Eddy, 2003), que aseguren una operación acorde con los requisitos de diseño.

En el presente trabajo se presentan resultados sobre el uso de una técnica molecular que actúa como marcador genético de codificación para el gen 16S rRNA, aplicada a un sistema de lodos activados a escala de laboratorio, para la detección y predicción de problemas de operación, en especial en la separación del efluente líquido y compactación de los sólidos, conocido como bulking. Los objetivos de la investigación fueron: a) Diseñar un reactor a escala de laboratorio para simular la operación de una sistema de lodos activados a escala real. b) Determinar mediante la técnica molecular de t-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polimorfism), el efecto de modificaciones en la operación (oxígeno, concentración de sustrato (relación F/M y otros), sobre la estructura bacteriana en el reactor, y c) Predecir producción de bulking a través de marcadores biológicos detectados con el t-RFLP.

## Metodología

### Sistema Experimental.

Se diseñaron reactores de un volumen de 2 L (Fig. 1), los que se inocularon con un concentrado de licor mezclado desde una planta de lodos activados en operación a escala real. El inóculo se mantuvo en operación batch secuencial hasta alcanzar la biomasa suficiente para dar paso a la operación continua. Los reactores se alimentaron con agua servida sintética según Kaewpipat & Grady (2002).

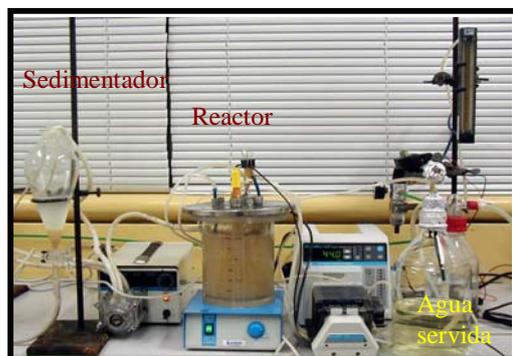


Figura.1. Modelo de reactor diseñado

### Parámetros de diseño

Los reactores se ajustaron al siguiente diseño: volumen reactor (L) 1,5; caudal afluente ( $Lh^{-1}$ ) 0,25; tiempo de retención hidráulico (h) 6; tiempo de retención celular (d) 4; tasa de reciclaje de lodo(%) 35; F/M ( $mgDBO_5/mgSSV^{-1}$ ) 0,5 (Viessman et al, 1985).

### Modificaciones operacionales.

En condiciones estables de operación se realizó disminución de: OD desde 3,0, 1,3 a  $0,5(mgL^{-1})$ ; relación F/M desde 100%, a 75%, 50% y 25%; baja de nutrientes desde C:N:P = 100:27:6, hasta 100:5:1. Esta última variable fue modificada a través de la composición del agua servida sintética, bajando la concentración de N mediante la peptona, suplementando la baja del carbono con almidón. La baja del P se realizó disminuyendo los fosfatos.

### Caracterización física y química de operación de los reactores.

Se realizaron mediciones en línea de  $T^0$ , pH y OD mediante sensores conectados a un dispositivo automático computarizado de adquisición de datos (Opto 22); mediciones diarias de SS, SSV, DQO total y soluble, y periódicas de IVL, NKT, P y  $NH^{4+}$ , según metodología estándar (S. Methods 20<sup>th</sup> ed.).

### Caracterización Biológica

La diversidad bacteriana se determinó utilizando como marcador el gen 16S rRNA mediante la técnica t-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polimorfism) (Liu et al, 1997). Los resultados fueron posteriormente validados por análisis de componentes principales (PCA) y cálculo del índice de diversidad de Shannon. La técnica se aplicó a muestras recolectadas desde reactores bajo operación normal y sometidos a los cambios previamente citados. El análisis mediante la técnica del t-RFLP incluye las siguientes etapas: 1. Muestra y extracción del DNA. 2. Amplificación del DNA por PCR con

primer fluorescente, marcado con 16S rRNA. 3. Digestión del DNA amplificado con enzimas de restricción. 4. Separación de los fragmentos por electroforesis en gel. 5. Secuenciación (pb) y reconocimiento de los fragmentos marcados.

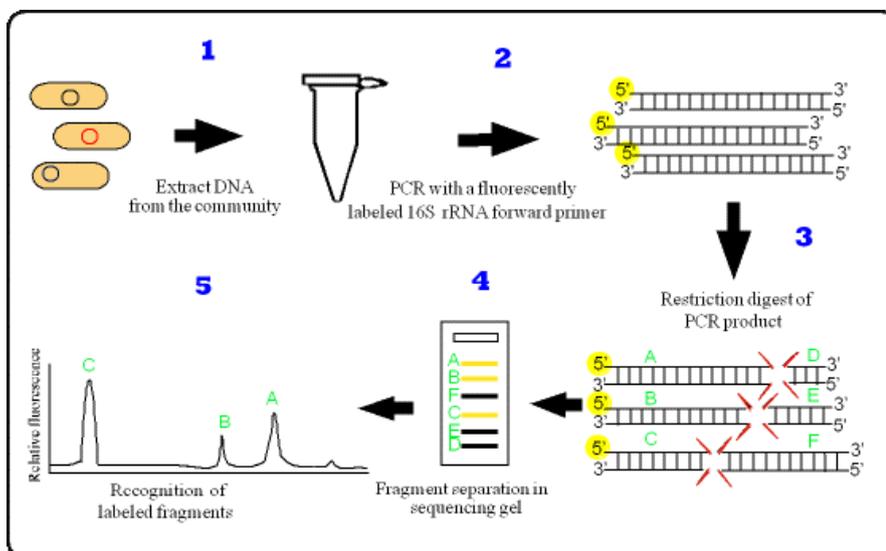


Figura 2. Esquema técnica análisis t-RFLP

## Resultados

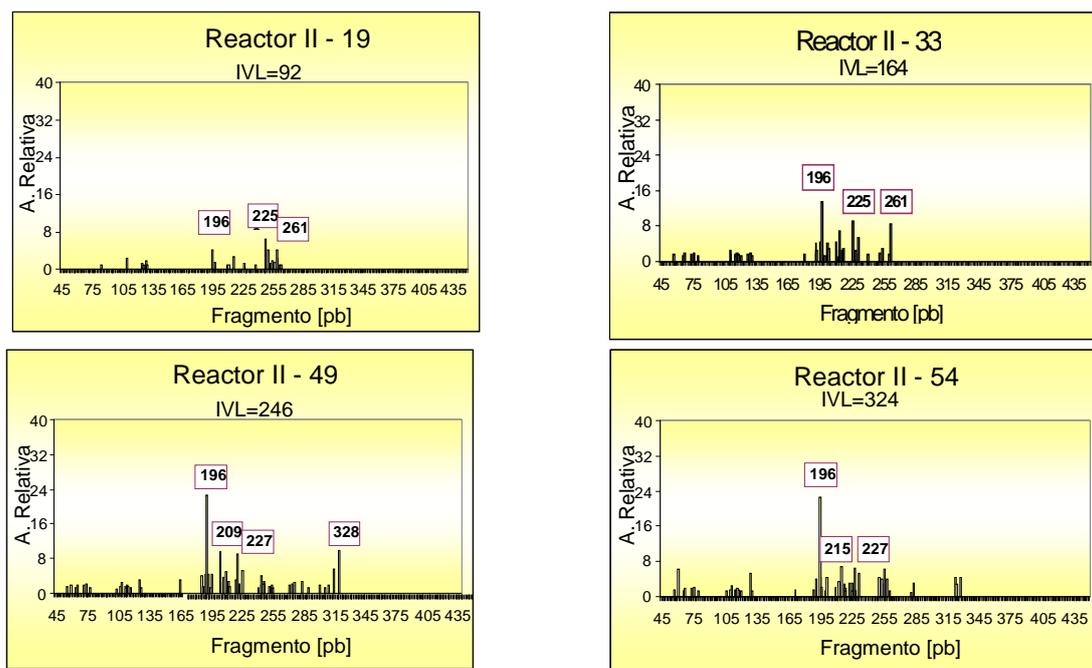
En la Tabla 1 se muestra la composición de parámetros físicos y químicos del inóculo utilizado, de los reactores bajo operación continua estable y con problemas de bulking, obtenidos en las experiencias. Se observa que en condiciones de operación normal el reactor de laboratorio logró emular la mayoría de los parámetros del licor mezclado de la planta real.

Tabla 1. Composición física y química del inóculo inicial y del licor mezclado en el reactor bajo flujo continuo en condiciones de operación normal y con bulking

Parámetro	Inóculo licor mezclado	Operación continua	Operación con Bulking
Oxígeno Disuelto(mgL <sup>-1</sup> )	--	3.0 – 4.5	1.5 – 4.8
pH	6.5 – 6.8	6.3 – 7.4	6.2 – 7.4
Temperatura (°C)	18 – 24	20 – 22	20 – 22
Demanda Química de Oxígeno soluble (mgL <sup>-1</sup> )	28 – 63	18 - 83	37 – 147
Sólidos Suspendidos (mgL <sup>-1</sup> )	1080 - 1430	1650 - 2430	1067 – 2081
Sólidos Suspendidos Volátiles (mgL <sup>-1</sup> )	840 - 1240	1500 - 2230	880 – 1895
Nitrógeno Total Kjeldhal (mgL <sup>-1</sup> )	105 - 150	75 - 185	--
Fósforo Total (mgL <sup>-1</sup> )	21 - 52	30 - 46	--
Nitrógeno Amoniacal (mgL <sup>-1</sup> )	21 - 52	29 - 44	19 – 35
Indice Volumétrico de Lodos (mLgSS <sup>-1</sup> )	57 - 89	64 - 128	163 – >400

Los resultados de t-RFPL de un reactor en operación normal analizado a los 20 días mostraron que los fragmentos más abundantes (>5%) fueron: 196 pb (pares de bases de DNA), 225 pb y 261 pb (Fig 3a).

Por un problema de operación, el día 28 el reactor permaneció sin alimentación y aeración por 20 horas, lo que después de 10 días generó bulking con un IVL sobre 300 mLgSS<sup>-1</sup>, mientras que a los 5 días los análisis de t-RFLP mostraron cambios en la estructura bacteriana: el día 33 el fragmento 196 pb subió a un 10% y los fragmentos 225 y 261 a 8% (Fig. 3b). Los días 49 y 54 el fragmento 196 pb se mantuvo en un 20%. (Fig.3c), sin que se lograra recuperar el reactor a valores normales de IVL (<150 mLgSS<sup>-1</sup>).



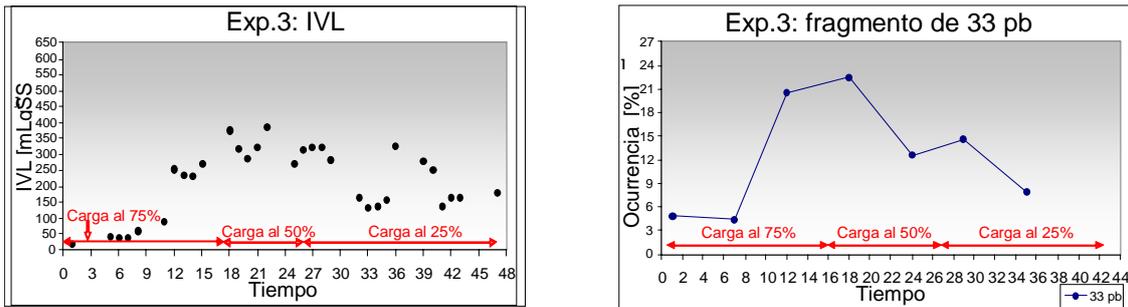
**Figura 3. Electroferogramas de t-RFLP de la estructura de fragmentos bacterianos.**  
a) operación normal (día 19), b) 5 días después de un corte de 20 h (día 33), y c) restablecimiento operacional, aún con bulking severo (días 49 y 54).

Los análisis de componentes principales (PCA) mostraron que los clusters obtenidos por los perfiles de t-RFLP correspondieron a su caracterización física y química durante la operación normal, pero no después del episodio de bulking. El índice de Shannon confirmó el cambio de la diversidad bacteriana.

Del episodio de bulking se estableció una genoteca. Se obtuvieron 70 secuencias, considerando un mismo filotipo aquellas secuencias con 99% de similitud, encontrándose en la genoteca 6 filotipos. 91.4% de las secuencias se relacionaron con una bacteria no cultivada aislada de una planta de lodos activados (Simpson, 2004). Otros 3 clones pertenecían a Betaproteobacteria (Comamonadaceae). Los dos clones restantes fueron relacionados a Gammaproteobacteria, específicamente a *Xanthomonas axonopodis*.

En las experiencias de disminución de OD, los electroferogramas confirmaron la predominancia (20%) del fragmento 196 pb, como representativo de bulking a concentraciones de 1 mgL<sup>-1</sup>; este fragmento se relaciona con una bacteria no cultivada cuyas secuencias fueron recuperadas desde contaminación equina (Simpson, 2004). Bajando el OD, a un valor promedio de 0,5 mgL<sup>-1</sup> aparece el fragmento 33pb, y según base de datos se asociaría a bacteria filamentosa del tipo *Leptothrix* sp, muy similar a *Sphaerotilus*, ambas típicas de sistemas deficitarios de OD y asociadas a producción de bulking (Bitton, 2005).

Como respuesta a la disminución de la relación F/M de 0,6 a 0,1 [mgDBO/mgSSV<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>] los electroferogramas mostraron un incremento del fragmento 33 pb que coincidió con producción de bulking, y un aumento de IVL de <50 a 400 mLgSS<sup>-1</sup> (Fig.4). El cultivo convencional desde el reactor logró el aislamiento de una bacteria filamentososa, cuyo análisis de frecuencia y análisis de t-RFLP con partidores específicos reafirmó la presencia del fragmento 33 pb, que podría corresponder al actinomicete *Thiothrix* y/o *Eikelboom* tipo 021N, ambos de genética muy similar.



**Figura 4. Aumento del fragmento 33pb por disminución de la relación F/M y aumento del IVL**

La experiencia de disminución de la relación de nutrientes a C:N:P=100:5:1, produjo una disminución sostenida de los sólidos suspendidos que a los 14 días de operación presentaba una biomasa de 500 mgSSL<sup>-1</sup>, una DQOs de 297 mgL<sup>-1</sup> y un IVL severo, que superó los 600 mLgSS<sup>-1</sup>. Posteriormente, el día 15 se restituyó la relación de nutrientes del agua servida sintética original a 100:27:5, sin embargo, después de 22 días el reactor no logró recuperar condiciones normales de operación. Pese a que el OD se mantuvo alto (mgL<sup>-1</sup> 4,3), la disminución de N y P a niveles bajos dieron como resultado un efluente con alta carga orgánica y una deficiente separación de sólidos en el sedimentador.

El análisis de t-RFLP indicó grandes variaciones en la diversidad bacteriana entre el inicio y final de la experiencia. Al inicio no se detectaron filotipos predominantes, el de mayor abundancia (3,61%), correspondió al fragmento de 215pb, otros fragmentos fueron 153,164 y 172pb, los que según las bases de datos corresponderían a bacterias no cultivadas. A los 14 días los electroferogramas mostraron una disminución en la abundancia relativa de los fragmentos, los que en su mayoría no superaron el 2%. Los fragmentos principales fueron 124, 126 y 186 pb; el fragmento 195 pb fue el de mayor abundancia, (5,55%), el que correspondería a una bacterias del tipo *Rhodopseudomonas* sp. Cabe destacar que pese al alto bulking producido en esta experiencia, los análisis de t-RFLP no reflejaron la presencia de bacterias filamentosas, las que probablemente se asocian a los fragmentos de las bacterias no cultivadas o no identificadas.

Considerando que los fragmentos de 196 pb y 33 pb, coincidentemente con los experimentos, aumentan su frecuencia relativa días antes de detectar bulking con los parámetros físico-químicos, se continúan estudios a fin de verificar si estos fragmentos podrían ser utilizados como sensores de operación, previo a la aparición de bulking. En la actualidad se realizan experiencias sobre el efecto del aumento del tiempo de retención celular en el reactor, su influencia en la eficiencia del proceso y posibles modificaciones de la diversidad bacteriana. Sin embargo, se aprecia una falencia en las bases de datos para el reconocimiento de los biotipos asociados a los fragmentos de pares de bases de DNA, de muestras provenientes de aguas residuales.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 20<sup>th</sup> edition. AWWA, APHA, WEF.

2. AMANN, R.I., W. LUDWIG & K.H. SCHLEIFER. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* v.59n.1p.143-169. 1995
3. ARUGA, S., KAMAGATA, Y., KOHNO, T., HANADA, S., NAKAMURA, K. AND KANAGAWA, T. Characterization of filamentous Eikelboom type 021N bacteria and description of *Thiothrix disciformis* sp. nov. and *Thiothrix flexilis* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.52 p.1309–1316. 2002.
4. BITTON G. *Wastewater Microbiology*, 3<sup>th</sup> edition, Willey Liss, ps.746. 2005.
5. KAEWPIPAT, K. & GRADY C.P.L. JR. Microbial population dynamics in laboratory-scale active sludge reactors. *Water Science and Technology*, v.46 n.1-2 p.19–27. 2002.
6. LIU, W.T., C.L. HUAN, J.Y. HU, L. SONG, S.L. ONG & W.J. NG. Denaturing gradient gel electrophoresis polymorfism for rapid 16S rDNA clone screening and microbial diversity study. *Journal of Bioscience and Bioengineering* v.93n.1 p.101-103.2002
7. METCALF & EDDY. *Wastewater Engineering and Reuse*, 4<sup>th</sup> edition McGraw-Hill. ps. 1819. 2003.
8. TEREHARA, T., HOSHINO, T., TSUNEDA, S., HIRATA, A. & INAMORI, Y. Monitoring the Microbial Population Dynamics at the Start-Up Stage of Wastewater Treatment Reactor by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Based on 16S rDNA and rRNA Gene Sequences”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.98 n.6 p. 425–428. 2004
9. SIMPSON, J.M, SANTO DOMINGO, J.W., REASONER, D.J. Assessment of equine fecal contamination: the search for alternative bacterial source-tracking targets. *FEMS Microbiological Ecology*, v.47 p.65-75. 2004
10. VIESSMANN, W. & HAMMER, M. *Water Supply and Pollution Control*, Fifth edition, Harper Collins, New York,pp 860 pp.1993.