



Seguimiento de un proceso de *bulking* causado por *Meganema perideroedes*

Las bacterias filamentosas son representantes ubicuos y, en ocasiones, claramente visibles en las comunidades biológicas presentes en los fangos activos de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) y residuales industriales (EDARI). El crecimiento excesivo de estos organismos pueden producir graves problemas de operación, como pueden ser las espumas y el esponjamiento. En concreto, las EDARI del sector lácteo son muy problemáticas debido al alto nivel de DQO soluble presente en sus afluentes. En una EDARI de sueros lácteos se identificó un problema de esponjamiento por el morfotipo *Nostocoida limicola* que posteriormente, con técnicas FISH, fue identificado como *Meganema perideroedes*. Se encontró una correlación positiva entre la deficiencia de oxígeno y la presencia de este organismo en el lodo activado.

Palabras clave

Bacterias filamentosas, *bulking*, problemas operacionales, *Meganema perideroedes*.

DETECTING A PROBLEM OF BULKING CAUSED BY THE MEGANEMA PERIDEROEDES BACTERIA

The filamentous bacteria are generally present in the microbiological communities of activated sludge of wastewater treatment plants (WWTP) and industrial (WWTPI). The excessive growth of these organisms could cause serious problems, foaming and bulking, for the operation of the WWTP. Specifically the WWTPI of the dairy sector are very problematic due to the high level of soluble DQO in the tributaries. In a dairy serum WWTPI there was a problem of bulking, caused by the morphotype *Nostocoida limicola*, which subsequently was identified as *Meganema perideroedes* using the FISH technique. There was a positive relationship between the deficiency of oxygen and the presence of this organism in the activated sludge.

Keywords

Filamentous bacteria, *bulking*, operational problems, *Meganema perideroedes*.

Eva Rodríguez

jefa de Laboratorio EDAR Tablada, Asociación Científica Grupo Bioindicación de Sevilla (GBS)

Estrella de la Concepción García

técnica en control de proceso de Aguambiente

José Luis Alonso Molina

responsable del Grupo de Química y Microbiología del Agua del Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente de la Universitat Politècnica de València



1. INTRODUCCIÓN

Las estaciones depuradoras de aguas residuales industriales (EDARI) del sector agroalimentario presentan propensión a sufrir alteraciones en la decantabilidad de sus lodos (Levantesi *et al.*, 2004; Kragelund *et al.*, 2006), debido principalmente al tipo de efluente que tratan, y a las variaciones de carga y caudal asociados a la producción.

Dentro del sector quesero, los sueros son especialmente problemáticos, ya que poseen una alta DQO y gran parte de ella es fácilmente biodegradable, ambiente que favorece el desarrollo de distintas bacterias filamentosas.

El filamento dominante encontrado en el presente estudio ha sido *Meganema perideroedes*, identificado inicialmente mediante técnicas ópticas como *Nostocoida limicola* con reacciones a tinciones no usuales.

Nostocoida limicola es muy usual en fangos activos, e incluye distintas especies que no son distinguibles solo por observación óptica y tamaño celular (Thomsen *et al.*, 2006; Nielsen *et al.*, 2009, Seviour 2010), por lo que se hace imprescindible la confirmación mediante la técnica de hibridación *in situ* con sondas

16S rDNA marcadas con fluoróforos (FISH) (Eikelboom, 2002), tal como han demostrado estudios genéticos de la secuencia del gen 16S rRNA (Seviour *et al.*, 2002). La información operacional disponible sobre este morfotipo, se asocia a bajos valores de la carga másica, de oxígeno disuelto y un importante componente industrial de las aguas residuales afluentes (Eikelboom, 2002; Jenkins *et al.*, 2004).

En concreto, la ecofisiología de *Meganema perideroedes* es muy versátil y puede utilizar una amplia variedad de sustratos orgánicos como el acetato, propionato, butirato, oléico, glucosa, galactosa, manosa, glicina y leucina bajo condiciones aerobias, pero no formico, piruvato o etanol (Kragelund *et al.*, 2005). Este filamento se desarrolla en EDARI con elevadas concentraciones de compuestos solubles, ya que posee una alta capacidad para producir biopolímeros de reserva dando lugar a poli-hidroxialcanoatos (PHA) (Kragelund *et al.*, 2005). De hecho McIlroy *et al.* (2015) han detectado esta especie en SBR optimizados para producir PHA para manufactura de plásticos.

También presenta cierta capacidad hidrofóbica y excretan algunos

enzimas extracelulares asociados a la superficie celular, aunque las células de *Meganema perideroedes* nunca presentan actividad exoenzimática extracelular, excepto en rupturas del proceso en las que un 15% de las células presentaban actividad lipasa. Bajo condiciones limitantes de oxígeno, *Meganema perideroedes* es capaz de usar el nitrato como aceptor terminal de electrones (condiciones anóxicas), si bien es un proceso menos efectivo (Kragelund *et al.*, 2005).

Con nitritos como único aceptor terminal, solo puede asimilar glucosa y acetato entre los sustratos ensayados por Kragelund *et al.* (2005), tanto para su crecimiento como compuestos de reserva. Bajo condiciones anaerobias, estos autores no han detectado actividad asimilatoria en ninguno de los compuestos ensayados. Este organismo es poco frecuente en EDAR con desnitrificación.

El objetivo del presente trabajo es utilizar la técnica FISH para la identificación del morfotipo *Nostocoida limicola* asociado con problemas de *bulking* en una EDARI de sueros de quesos y evaluar las condiciones asociadas al desarrollo de este filamento en esta EDARI en concreto.

FIGURA 1. Esquema del proceso de depuración en la EDARI a estudio.

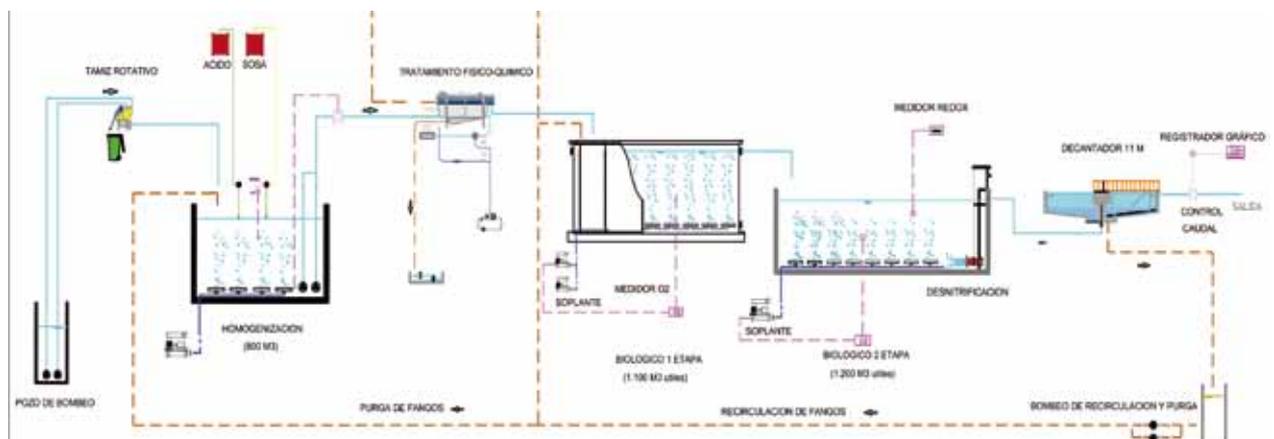


TABLA 1

VALORES PROMEDIOS ANUALES EN LA EDARI

Zona	pH (u. de pH)	SST (mg/L)	SSV (mg/L)	Conductividad (μ S/cm)	V30 (mL/L)	DQO (mg/L)	DQO soluble (mg/L)	N-Amonio (mg/L)	NT (mg/L)	PT (mg/L)	Aceite (mg/L)
Entrada	7,38	1.191		7.580	-	19.919	-	-	-	-	-
Homogenización	5,62	2.952	-	8.193	-	13.329	-	-	-	-	332
Salida fisicoquímico	5,55	527	-	8.252	-	4.945	6.591	-	24	91	28
Biológico 1	7,86	4.424	4.170	6.810	764	-	488	13	24	741	741
Biológico 2	7,44	4.168	3.530	6.910	660	-	94	23	29	8	8

2. MATERIAL Y MÉTODOS

La EDARI objeto de este estudio trata los sueros de una quesería que llegan con un pH en torno a 5, tras lo cual se tratan en un tanque de homogenización donde se neutralizan con sosa. Posteriormente se añade coagulante y floculante (cloruro férrico y polielectrolito catiónico) y el afluente entra en dos reactores biológicos en serie (R1 y R2) aireados mediante soplantes. En ambos reactores se controla el proceso con sondas de oxígeno y redox, según el esquema de la **Figura 1**.

La EDARI presenta episodios de *bulking* (hinchazón de fangos) recurrentes asociados a dos causas muy acusadas. La primera de ellas, intrínseca al tipo de afluente que trata, tras el ajuste fisicoquímico, se detecta un alto nivel de fracción soluble de la DQO que usualmente se mueve entre un 65-70%, pero que puede llegar a ser hasta del 90%. La segunda problemática va relacionada con el exceso de producción, que provoca puntas de caudal de vertido hasta tres veces superiores a las de diseño, por lo que tanto el proceso fisicoquímico como la capacidad de aireación son totalmente insuficientes.

El caudal diario es de aproximadamente 200 m³ y la DQO de diseño

de 4.500 mg/L. En la **Tabla 1** se definen las concentraciones promedio anuales en sus distintas fases.

Para realizar el seguimiento y resolución de esta situación se estableció un período de muestreo comprendido entre marzo y junio de 2015. Durante este período, en una primera fase se ha caracterizado al filamento dominante con microscopía óptica de contraste de fases y campo claro, y la técnica FISH (marzo 2015) y, en una segunda fase, se ha evaluado el tipo de filamento dominante y su nivel de crecimiento en función de los parámetros operacionales y fisicoquímicos (abril-junio 2015). Los análisis fisicoquímicos se realizaron de forma quincenal según los Métodos Normalizados (APHA, AWWA, WPCF).

El análisis microbiológico completo se ha realizado de forma quincenal, valorando el IF, según protocolo establecido en Rodríguez *et al.* (2008). La identificación de bacterias filamentosas se hizo según los manuales de Jenkins *et al.* (1993 y 2004), Seviour y Blackall (1999) y Eikelboom (1975 y 2002), realizándose el conteo de m/mL de filamentos según la técnica descrita en Salvadó (1990). Se han realizado las siguientes tinciones para la identificación de las

bacterias filamentosas: Gram, Neisser y polihidroxibutirato.

Desde el mes de junio hasta diciembre del 2015 no se pudo continuar con la misma frecuencia de muestreos, pero pudieron evaluarse los efectos que tuvieron los procesos de nitrificación-desnitrificación sobre la estructura del flóculo y sobre la abundancia de filamentos.

Las sondas que se han utilizado con la técnica FISH para la identificación de las bacterias filamentosas presentes en las muestras de fangos activos se describen en la **Tabla 2** (Loy *et al.*, 2007). Las hibridaciones se han realizado a 46 °C durante 2 h y el lavado para eliminar el exceso de sonda no hibridada a 48 °C durante 15 minutos. Para la cuantificación de las bacterias filamentosas se ha utilizado el criterio subjetivo (FI) de Jenkins *et al.* (2004) (**Tabla 3**).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tal como se ha especificado en material y métodos, la primera fase de este estudio presentaba como objetivos caracterizar el filamento tanto desde microscopía óptica como por FISH, para posteriormente evaluar las variaciones de densidad del filamento en función de los parámetros fisicoquímicos y operacionales.



TABLA 2

SONDAS UTILIZADAS PARA IDENTIFICAR LAS BACTERIAS FILAMENTOSAS DE LA EDAR. Nota:

¹ *Candidatus "Alysiosphaera europaea"* 30; ² *Candidatus "Monilibacter batavus"*; ³ *Meganema perideroedes*; ⁴ *Chloroflexi* variante A morfotipo 0092; ⁵ Sonda ayudante *Chloroflexi* variante B morfotipo 0092; ⁶ Morfotipo *Nostocoida limicola II*, phylum *Chloroflexi*; ⁷ El morfotipo 0803 pertenece al género *Caldilinea* dentro del filo *Chloroflexi*.

Sonda	Secuencia (5'-3')	Especificidad	% F ¹
EUB 338 I	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	<i>Bacteria</i>	20
EUB 338 II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	<i>Planctomycetes</i>	20
EUB 338 III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	<i>Verrumicrobiales</i>	20
EUB338IV	GCAGCCTCCCGTAGGAGT	<i>Bacteria</i>	20
ALF968	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	<i>Alphaproteobacteria</i>	35
GAM42a	GCCTTCCCACATCGTTT	<i>γ Proteobacteria</i>	35
BET42a	GCCTTCCCACCTCGTTT	<i>β Proteobacteria</i>	35
CF319	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	<i>Cytophaga</i>	35
GNSB941	AAACCACACGCTCCGCT	<i>Chloroflexi</i>	35
CFX1223	CCATTGTAGCGTGTGTGMG	<i>Chloroflexi</i>	35
Noli-644	TCCGGTCTCCAGCCACA	<i>Ca."A. europaea"</i> ¹	35
MC2-649	CTCTCCCGGACTCGAGCC	<i>Ca."M. batavus"</i> ²	35
EU12-645	TCTCACCTCAAGATCGC	<i>M. perideroedes</i> ³	35
EU26-653	TCGCCTCTCTCATCCTC	<i>M. perideroedes</i> ³	35
Meg983	CGGGATGTCAAAGGTGG	<i>M. perideroedes</i> ³	35
Meg1028	CTGTACCGAGTCCCTTGC	<i>M. perideroedes</i> ³	35
G123T	CCTTCCGATCTCTATGCA	<i>Thiothrix spp.</i>	40
G1B	TGTGTTGAGTTCCTTGC	<i>T.disciformis</i>	30
G2M	GCACCACCGACCCCTTAG	<i>T. eikelbomii</i>	35
G3M	CTCAGGGATTCTGCCAT	<i>T. defluvii</i>	30
TNI	CTCCTCTCCCACATTCTA	<i>T. nivea</i>	45
TFR	CTCCTCTCCCACACTCTA	<i>T. fructosivorans</i>	35
TEI	TCCCTCTCCCACATTCTA	comp. TNI y TFR	45/35
CFX197	TCCCGAGCGCCTGAACT	<i>Chloroflexi var. A</i> ⁴	40
CFX197comp	TCCCGAAGCGCCTGAACT	<i>Chloroflexi var. A</i>	40
CFX223	GGTGTGCTCCTCCAG	<i>Chloroflexi var. B</i> ⁵	35
CFX223 H202	AGCGCCTGAGCTTCAGTCATC	<i>Chloroflexi var. B</i>	35
AHW183	CCGACACTACCCACTCGT	<i>N. limicola II</i> ⁶	35
Caldi-0678	TTCCACCACTACCCGGG	<i>Caldilinea</i>	30
Comp1-Caldi-0678	TTCCACCACTACCCGGG	Sonda competidor 1	30
Comp2-Caldi-0678	TTCCACCGCTACCCGGG	Sonda competidor 2	30
T0803-0654	ACACCCTCTCACYRCCT	Morfotipo 0803 ⁷	30
T0803ind-0642	CTGCCTCAAGCTACTCAG	Morfotipo 0803	30
h1 T0803ind-0607	AGTTAAGCCAGGAGATTT	Helper	30
h2 T0803ind-0625	TTTCCAACGACCCCTCCC	Helper	30
h3 T0803ind-0662	GAATTCTACACCCCTCTC	Helper	30
h4 T0803-0680	ATTCCACCACTACCCGG	Helper	30

3.1. FASE IDENTIFICATIVA POR MICROSCOPIA ÓPTICA

Durante el periodo inicial, se caracterizo el filamento dominante. Ópticamente se identificó según el Manual de Jenkins *et al.* (2004) como *Nostocoida limicola II*, con una morfología del tricoma atípica: *Meganema perideroedes* (*Alphaproteobacteria* del grupo de las *Nostocoida*), con características ópticas similares a *Thiothrix-T021N* (Kragelund *et al.*, 2006), pero con respuesta negativa al test del azufre.

La caracterización morfológica y reactiva a tinciones quedó definida en la **Tabla 4**.

En la **Figura 2** se recogen algunos de los aspectos más significativos en el filamento dominante en la EDARI, tanto *in vivo* como en reactiva a las distintas tinciones.

El efecto principal de la proliferación filamentosa es la disgregación flocular. Gracias a la robustez de este filamento, incluso a bajas concentraciones, es capaz de producir un importante esponjamiento del fango. Su desarrollo parece venir potenciado por altos niveles de fracción de DQO soluble combinado con limitaciones de oxígeno por sobrecarga en la EDARI. Respecto otros filamentos se han identificado a *Thiothrix-T021N*, *T0041-0675* y *Haliscomenobacter hydrossis*.

Como suele ser usual en afluentes con altas fracciones solubles de DQO, en este sistema juega un papel muy importante los gránulos de polihidroxialcanoato (PHA) y Neisser, encontrándose reacción positiva tras la tinción, como puede apreciarse en la **Figura 3**. Este aspecto es indicador de reservas de carbono y fósforo intracelulares que contribuyen, en función del estado metabólico de estos, a procesos viscosos.

Meganema perideoeres tiene alta capacidad para formar PHA (Kragelund *et al.*, 2005 y 2006). Las células de *Meganema* crecen fundamentalmente en presencia de sustratos solubles de cadena corta (Kragelund *et al.*, 2005).

3.2. FASE IDENTIFICATIVA POR TÉCNICA FISH

Las características morfológicas de este filamento se ajustan a la descripción realizada por Eikelboom y Geurkink (2002) como *Meganema perideoeres*. El morfotipo *Meganema perideoeres* se parece a *Thiothrix eikelbomii* (Eikelboom, 2006) y su identificación es imprescindible confirmarla mediante la técnica FISH (Kragelund *et al.*, 2006). La bacteria filamentososa *Meganema perideoeres* pertenece a la clase *Alfaproteobacteria*. En las Figuras 4 y 5 se muestran filamentos de *Meganema perideoeres* identificados con las sondas ALF968, Meg983/Meg1028mix y EU12-645/EU12-653mix.

Otras bacterias filamentosas identificadas con la técnica FISH con valores de FI > 3 han sido identificadas con las sondas G123T/G2M (*Thiothrix/Thiothrix eikelbomii*) y GNSB941/CFX1223 (filo *Chloroflexi*) y T0803-654 (Morfotipo 0803 género *Caldilinea*) (Figura 6)

El nivel de abundancia (FI) de los distintos filamentos identificados con la técnica FISH se indican en la Tabla 5.

TABLA 3
CRITERIOS DE VALORACIÓN DE JENKINS ET AL. (2004) PARA CALIFICAR LA ABUNDANCIA DE BACTERIAS FILAMENTOSAS

Índice de filamentos (IF)	Criterio de abundancia	Descripción
0	Ninguna	Ningún filamento presente
1	Pocos	Pocos filamentos y de forma casual en el flóculo
2	Algunos	Filamentos aproximadamente en la mitad de los flóculos
3	Comunes	Filamentos en todos los flóculos con baja densidad (1-5/flóculo)
4	Muy comunes	Filamentos en todos los flóculos con densidad media (5-20/flóculo)
5	Abundantes	Filamentos en todos los flóculos con alta densidad (>20/flóculo)
6	Excesivos	Más filamentos que flóculos, ocupando los flóculos y/o los espacios interfloculares

TABLA 4
CARACTERÍSTICAS DOMINANTES EN EL FILAMENTO DOMINANTE EN LA EDARI DE SUEROS LÁCTEOS

Característica predominante	
Bacteria filamentososa	Filamento dominante en EDARI sueros lácteos
Tinción Gram	-
Tinción Neisser Tricoma	-
Tinción Neisser Tricoma gránulos	+
Otras inclusiones celulares	Fuertemente positiva en PHB
Diámetro Tricoma (µm)	En torno a 1,5 - 2
Longitud Tricoma (µm)	Muy largos, usualmente superior a 200
Morfología Tricoma	Torcidos o enrollados
Localización Tricoma	Interior o extendiéndose
Septos celulares visibles	Sí
Constricciones septos celulares	Claramente visible
Vaina	No
Crecimiento epifítico	No
Morfología celular	Células achatadas o redondeadas. irregulares

FIGURA 2. Caracterización óptica del filamento dominante. Contraste fases y campo claro. 1000x. In vivo, Tinción Gram, Neisser y PHB.

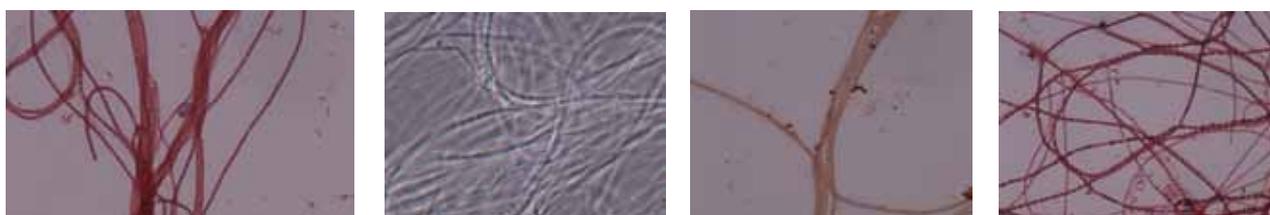




FIGURA 3. Actividad gránulo Neisser y PHB positivo. Tinción PHB y Neisser, 1000x. Campo claro.



FIGURA 4. FISH bacterias filamentosas A) bacteria sondas EUB338mix (verde), B) clase *Alfaproteobacteria* sonda ALF 968 (rojo), C) bacteria sondas EUB338mix (verde) y clase *Alfaproteobacteria* sondas ALF968+EUB338mix (naranja), 1000X.

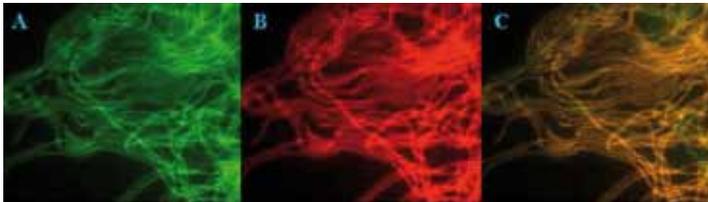


FIGURA 5. A) bacterias filamentosas contraste de fases, B) bacteria sondas EUB338mix (verde) y *Meganema perideroedes* sondas Meg983/Meg1028mix+EUB338mix (naranja) M, C) *Meganema perideroedes* sondas EU12-645/EU12-653mix (rojo), 1000X..

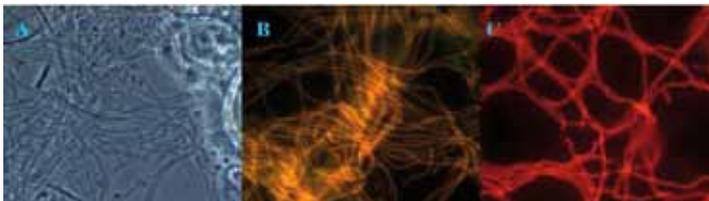


FIGURA 6. A) bacteria sondas EUB338mix (verde) y *Thiothrix* sondas G123T+EUB338mix (naranja), 600X; B) Morfotipo 0803 (género *Caldilinea*) sonda T0803-0654 (rojo), 1000X; C) "*Candidatus Alysiosphaera europaea*" sonda Noli644 (rojo), 1000X.



» El morfotipo *Meganema perideroedes* se parece a *Thiothrix eikelbomii* y su identificación es imprescindible confirmarla mediante la técnica FISH

3.3. FASE EVALUATORIA ENTRE INCIDENCIA DEL FILAMENTO Y PARÁMETROS OPERACIONALES Y FISCOQUÍMICOS.

El seguimiento microbiológico muestra la evolución recogida en la **Figura 7**. El seguimiento operacional y fisicoquímico realizado sobre la EDARI define dos problemáticas básicas que actúan directamente sobre la microbiota del sistema. Estas han quedado reflejadas en la **Figura 8**, donde puede observarse que tanto el estado de sobrecarga de DQO frente a diseño, como la altísima fracción soluble de esta, es prácticamente continuo.

La aparición de *Meganema perideroedes* en este tipo de afluentes puede considerarse como habitual, tal como se ha descrito en ambientes similares, junto con *Thiothrix sp.* (Figueroa *et al.*, 2015; Beccari *et al.*, 2009; y Thomsen *et al.*, 2006).

La tasa específica de utilización por célula de *Meganema perideroedes* es de $1,9 \times 10^{-15}$ mol de glucosa/hora y de $4,1 \times 10^{-15}$ mol de acetato/hora, mientras que la tasa específica de utilización de *Thiothrix sp.* por célula es de $3,1 \times 10^{-15}$ mol de acetato/hora. Los valores de la constante de saturación K_s para el acetato son de $1,8 \mu\text{M}$ para *Meganema perideroedes* y $2,4 \mu\text{M}$ para *Thiothrix sp.* (Nielsen *et al.*, 2003).

Estos valores explican la convivencia de ambas especies ante fracciones de DQO soluble muy altas y la fuerte implicación de *M. perideroedes* en el proceso viscoso al metabolizar más rápidamente sus sustancias de reserva bajo condiciones de estrés. *Meganema perideroedes* tiene más capacidad de almacenar PHA que *Thiothrix sp.* Bajo alimentación con acetato, McIlroy *et al.* (2015) demostraron que se producía crecimiento de *M. perideroedes*,

TABLA 5

CUANTIFICACIÓN A PARTIR DEL ÍNDICE SUBJETIVO (FI)

Sondas	Índice de abundancia	
	11/03/15	20/05/2015
ALF 968	6	4
GNSB941/CFX1223 mix	4	3
CF319a	0	0
Meg 983/Meg 1028 mix	6	4
Noli-644	1	1
MC2-649	1	0
SNA	1	0
G123T	5	4
G2M	5	4
TNI	0	0
TFR	0	0
G1B	0	0
G3M	0	0
Caldi-0678	5	4
T0803 0654	5	4
T803ind-0642	3	0
CFX67a	0	0
CFX67b	0	0
CFX197	0	0
CFX223	0	0
CHL 1851	0	0
AHW 183	1	0

si tras la dosificación de acetato se generaba un periodo de hambruna.

Esta capacidad de almacenaje ha repercutido en los importantes problemas de viscosidad detectados al comienzo del estudio. En la **Figura 9** se puede apreciar cómo la viscosidad presente en el fango activo impide la toma de muestras mediante una pipeta Pasteur.

Este problema de viscosidad está relacionado con altas reservas de PHA, típica en afluentes del sector agroalimentario (Baljeet *et al.*, 2014), presente en los filamentos

de *Meganema perioedes*, junto con niveles de oxígeno y redox muy bajos, característicos de las primeras semanas del presente estudio (**Figura 10**).

Teniendo en cuenta que no presenta actividad anaeróbica (Kragelund *et al.*, 2006), y que no dispone de actividad exoenzimática (por lo que depende totalmente de la disponibilidad de la fracción soluble de la DQO), el mayor desarrollo de este filamento durante el periodo de déficit de oxígeno y bajos niveles redox (estado anaeróbico) debe achacarse

a otras causas distintas al metabolismo propio de la bacteria.

Bajo condiciones anaeróbicas, como las ocurridas durante este periodo, se producen procesos fermentativos que fraccionan la DQO a ácidos grasos de cadena corta (Baljeet *et al.*, 2014). Además, *Meganema perioedes* puede almacenar polifosfatos bajo estas condiciones (Kragelund *et al.*, 2006), lo que hace a esta bacteria más competitiva al disponer de reservas tanto de carbono (Gránulos PHA) como de polifosfatos (Gránulos Neisser).

En este sentido, Mcllroy *et al.* (2015) definen dos estrategias para controlar a *Meganema perioedes*: trabajar con cargas másicas altas si las fracciones de la DQO son muy elevadas (acetato en su estudio); y adicionar biosoportos que reduzcan la fracción altamente biodegradable del sistema.

Las medidas operacionales tomadas en planta, con mejora sustancial de la aireación a partir de mayo, permiten un control poblacional de este filamento, tal como queda reflejado en la **Figura 11**.

A pesar de la nueva situación de déficit de oxígeno ocurrida durante el mes de junio (no acompañada de procesos anaeróbicos), tal como se aprecia en el redox de la **Figura 10**, no se producen crecimientos desmedidos del filamento. Esto está relacionado con la implantación de un proceso de nitrificación-desnitrificación desde el mes de mayo. La capacidad de *Meganema perioedes* de metabolizar NO_3 es menor que para el NO_2 (Kragelund *et al.*, 2005; Mcllroy *et al.*, 2015). El ajuste de los periodos de nitrificación-desnitrificación se estuvo optimizando durante varios meses. Durante este tiempo se observó que el IVF de los dos reactores iba descendiendo pau-



FIGURA 7. Seguimiento microbiológico.

FECHA	8/4/15	14/4/15	28/4/15	6/5/15	15/5/15	19/5/15
OXÍGENO R1/R2(ppm)	0,0/0,48	0,8/0,32	3/0,3	5,7/1,1	3,6/0,9	4,8/0,2
DQO ENTRADA (mg/L)	8.999 (Doble diseño)	9.805 (Doble diseño)	4.782 (Diseño)	5.514 (1,2 diseño)	5.949 (1,3 diseño)	5.739 (1,3 diseño)
% DQO SOLUBLE	91	88	100	88	87	85
MLSS (mg/L)	4.485	4.782	8.812	4.289	5.059	5.174
V30	590	880	960	280	575	345
IVF	220	202	124	40	89	-
REDOX R2 (mv)	-110	-152	88	113	29	-85
NIVEL DE VISCOSIDAD	ALTO	MUY ALTO	MEDIO	MEDIO	MEDIO	MEDIO
ESTRUCTURA FLOCULAR						
FILAMENTOS R1/R2 (m/mL)	1211 / 990	5467 / 900	-	987 / 388	890 / 120	392 / 155
MICROORGANISMOS	ESCASOS	NO EXISTEN	MEJORA SUBSTANCIAL DEL FLOCULO Y REDUCCION FILAMENTOS. APARICION COLONIAS MUCOSAS	COLONIAS MUCOSAS. NIVEL OXIDACION AVANZADO. DOMINAN AMEBAS TESTACEAS DE PEQUEÑO TAMAÑO	DESNITRIFICACION EN R2 DISMILUCION COLONIAS MUCOSAS Y AMEBAS TESTACEAS PEQ. <i>Cryptosphaera</i>	DESNITRIFICACION EN R2. DIVERSIDAD PROTISTAS CORRECTA

FECHA	21/5/15	3/6/15	11/6/15
OXÍGENO R1/R2(ppm)	6,75/0,25	1,1/0,1	0,9/0,1
DQO ENTRADA (mg/L)	No disponible- VERTIDO SUERO	No disponible	8.450 (1,9 diseño)
% DQO SOLUBLE	No disponible	No disponible	77
MLSS (mg/L)	5.283	9.271	9.198
V30	615	720	515
IVF	116	78	66
REDOX R2 (Mv)	11	-4,5	3
NIVEL DE VISCOSIDAD	MEDIO	MEDIO	MEDIO
ESTRUCTURA FLOCULAR			
FILAMENTOS R1/R2 (m/mL)	720 / 205	204 / 160	142 / 136
MICROORGANISMOS	EL FLÓCULO PIERDE AGREGACIÓN. AUMENTO NIVEL FILAMENTOS. ALTA DIVERSIDAD PROTISTAS.	COLONIAS MUCOSAS. ALTA DIVERSIDAD DE PROTISTAS.	MICROFLOCULOS-AELOSOMA SP.

» *Meganema perideroedes* genera importantes problemas de bulking, si bien en el presente estudio no ha llegado a formar espumas. Los procesos de nitrificación-desnitrificación parecen limitar el crecimiento de esta bacteria, siendo importante evitar nitrificaciones parciales que aumenten los niveles de nitritos en el sistema

FIGURA 8. Evolución del caudal y del porcentaje de DQO soluble de entrada al reactor biológico durante el periodo de estudio.

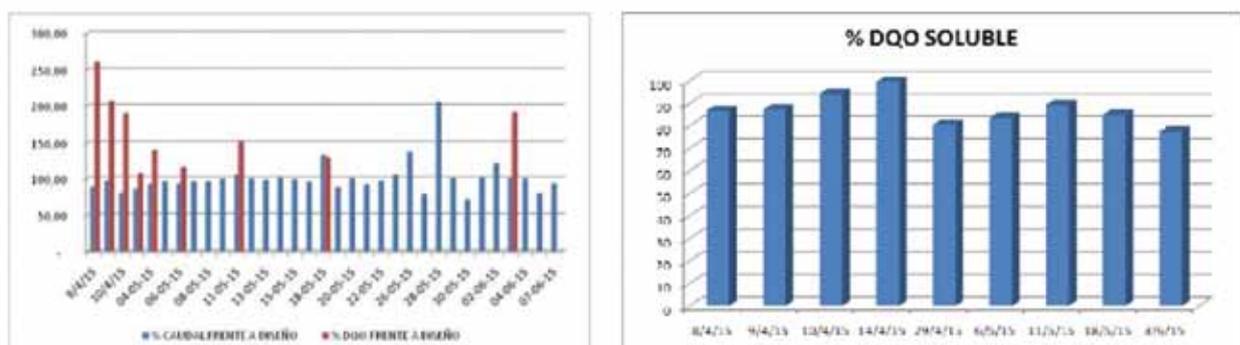
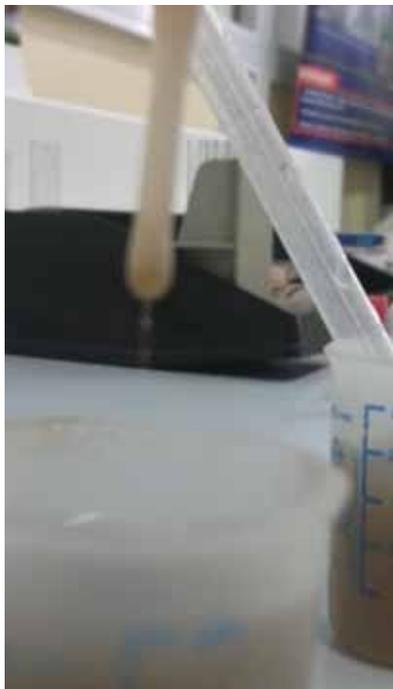


FIGURA 9. Viscosidad presente en el fango activo durante los primeros muestreos que impide la separación correcta del mismo para tomar una gota con una pipeta Pasteur.



latinamente (**Figura 12**) hasta alcanzar valores muy bajos y estables en el mes de diciembre.

Paralelamente a este descenso del IVF, se produjo un aumento del grado de compactación del flóculo (**Figura 13**). Esto mejoró la decantación y la calidad del agua de vertido. Sin embargo, no se observó un descenso significativo del número de bacterias filamentosas durante este periodo de estudio.

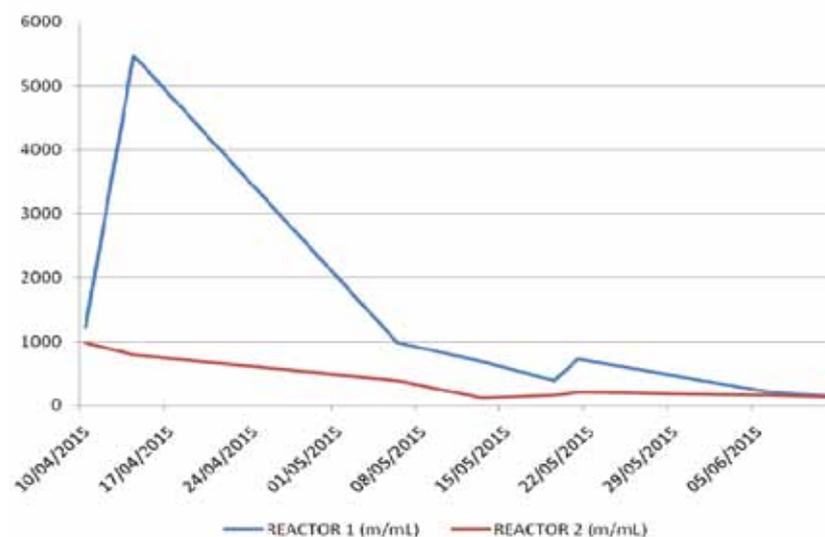
A nivel biológico ha sido significativa la aparición de colonias de aspecto globoso (**Figura 14**), vinculadas con una reducción del nivel de filamentos.

La comunidad protozoaria relacionada con la mejor estructura del fango ha sido: *Epicarchesium* (típico de procesos con nitrificación-desnitrificación), pequeños flagelados, *Vorticella convallaria*, *Cryptodiffugia*, amebas desnudas, *Euglypha*, *Acineria uncinata* y *Euplotes aedicu-*

FIGURA 10. Evolución de la V30 y niveles de oxígeno y redox a lo largo del periodo de estudio.



FIGURA 11. Evolución del nivel de filamentos (m/mL) a lo largo del periodo de estudio.



latus (**Figura 15**). La dominancia de *Cryptodiffugia* es indicativa de procesos de sobrecarga. La población de ciliados es de baja diversidad y densidad típicas de procesos N/DN.

Respecto a micrometazoos, se han detectado rotíferos vinculados con buenas calidades y *Aelosoma variegatum* presente al final del estudio tras un episodio de envejecimiento del fango activo que degeneró en un proceso de fango rojo (**Figura 16**).

4. CONCLUSIONES

El análisis biológico integral de esta muestra define un proceso de *bulking* generado por la bacteria *Meganema perideroedes*, que se desarrolla gracias a los altos niveles de fracción soluble de la DQO afluente y a limitaciones de oxígeno. Los gránulos de PHA son indicadores de altas fracciones de DQO soluble en el afluente.

Los procesos anaerobios (-100 mV niveles redox) potencian la fermenta-



ción de la DQO y favorecen la asimilación de polifosfatos por parte de *Meganema perideroedes*, lo que la hace más competitiva respecto al resto de bacterias ante situaciones de estrés, como puede ser el déficit de oxígeno. Los gránulos Neisser en este filamento son indicadores de estos procesos.

Operar a bajas CM (consecuencia de la alta DQO soluble que es internalizada por parte de las bacterias en forma de PHA y, por lo tanto, no utilizable hasta que sea metabolizado) y con niveles de oxígeno limitados, favorecen el desarrollo de este filamento. Ante variaciones en la carga es necesario aumentar la CM con el fin de evitar periodos de hambruna y disminuir la competitividad de este filamento.

Meganema perideroedes genera importantes problemas de *bulking*, si bien en el presente estudio no ha llegado a formar espumas.

La comunidad formada por *Meganema perideroedes*, *Thiothrix-T021N*, *T004-0675* y *Haliscomenobacter hydrosis* comparten condiciones ecológicas de crecimiento, asociado a limitación de oxígeno y alta disponibilidad de DQO soluble.

Los procesos de nitrificación/desnitrificación parecen limitar el crecimiento de *Meganema perideroedes*, siendo importante evitar nitrificaciones parciales que aumenten los niveles de nitritos en el sistema.

Los procesos de nitrificación-desnitrificación mejoran el grado de compactación del flóculo, disminuyendo el IVF y aumentando, por tanto, la capacidad de decantación del fango. En consecuencia, se produce una mejora en la calidad del agua de vertido.

La comunidad biológica formada por colonias globosas, *Epicarchesium*, *Cryptodiffugia*, *Euplotes aedicularis* y rotíferos está vinculada a buenas condiciones floculares.

FIGURA 12. Evolución del IVF en el periodo julio 2015-enero 2016.

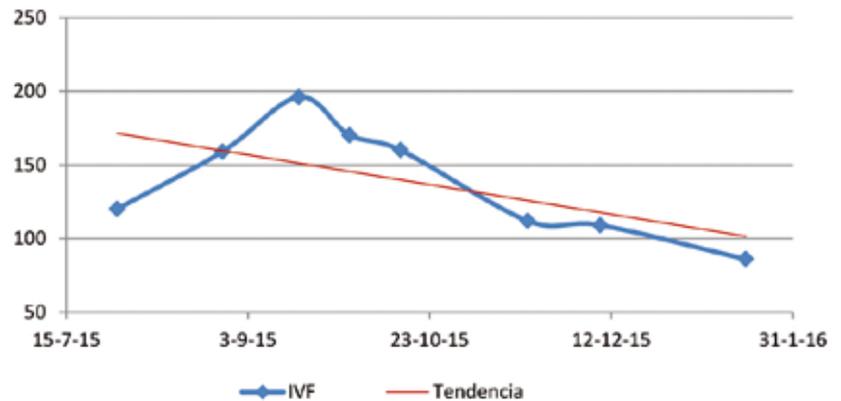


FIGURA 13. De izquierda a derecha: aspecto del flóculo en los meses de octubre, noviembre y diciembre. In vivo. 100x. Contraste de fases.

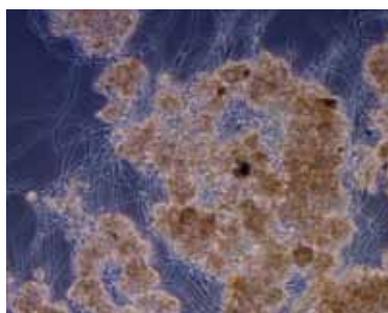
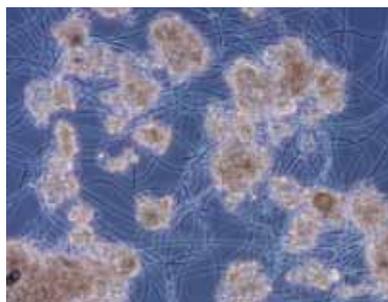
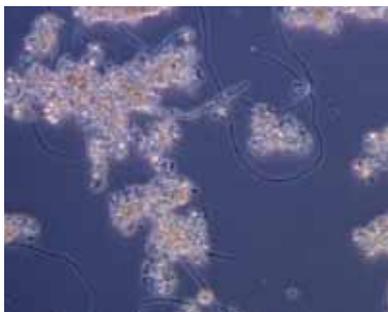


FIGURA 14. Distintas colonias de aspecto globoso, encontradas en la muestra. In vivo. 100 y 200x. Contraste de fases.

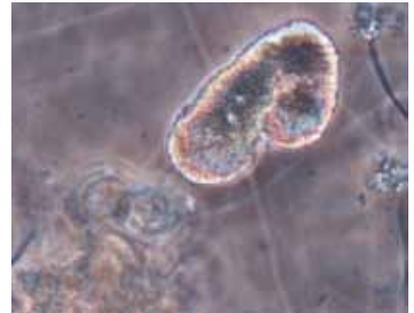
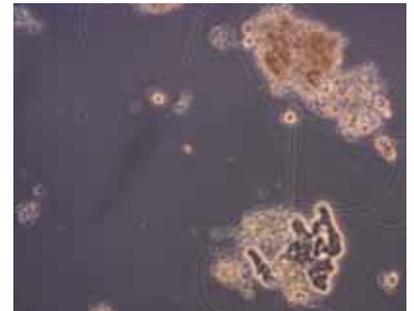


FIGURA 15. *Epicarchesium* y *Acineria uncinata*. In vivo. 100 y 400x. Contraste de fases.

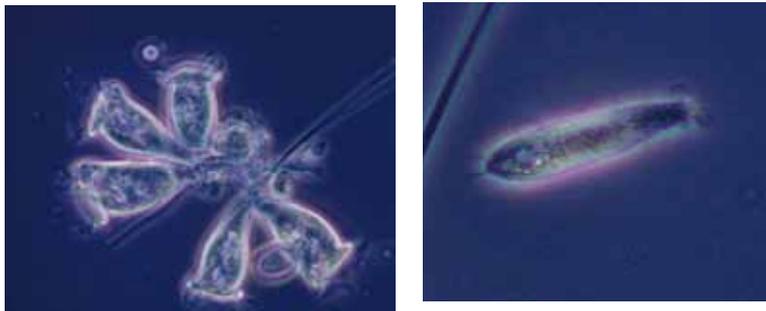
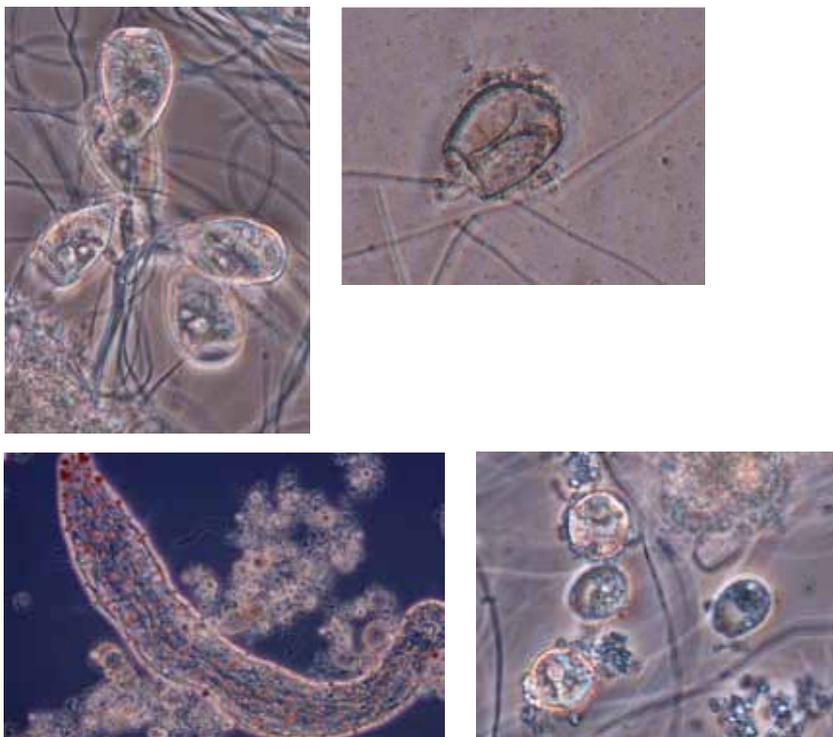


FIGURA 16. Distintos microorganismos presentes en las muestras vinculados con buenas calidades del fango activo. 400x y 1000x. Contraste de fases. In vivo *Euplotes aediculatus*, ameba desnuda, *Epicarchesium* sp. *Aelosoma variegatum* y tecas de *Cryptodiffugia* en el interior flocular.



5. AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren dejar constancia de su agradecimiento a cada una de las empresas y centros a los que pertenecen, y a Emasesa por su apoyo y respaldo al trabajo.

Bibliografía

[1] Baljeet, S.; Grewal, A.; Kumar, P. (2014). Biotechnological production of polyhydroxyalkanoates: A review on trends and

latest developments. Chinese Journal of Biology. Volume 2014 doi.org/10.1155/2014/802984

[2] Beccari, M.; Bertin, L.; Dionisi, D.; Fava, F.; Lampins, S.; Majoen, M.; Valentino, F.; Vallini, G., Villano, M. (2009). Exploiting olive oil mill effluents as a renewable resource for production of biodegradable polymers through a combined anaerobic-aerobic process. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 6: 901-908

[3] Eikelboom, D.H.; Geurkink, B. (2002). Filamentous micro-organisms observed in industrial activated sludge plants. Water Science and Technology, 46(1-2):535-542.

[4] Eikelboom, D.H. (1975). Filamentous organisms observed in activated sludge. Water Research, 9: 365-388.

[5] Eikelboom, D.H. (2002). Process control of activated sludge plants by microscopic investigation. IWA 2002.

[6] Eikelboom, D.H. (2006). Identification and control of filamentous micro-organisms in industrial wastewater treatment plants (CD-ROM). IWA Publishing, Londres.

[7] Figueroa, M.; Val del Rio, A.; Campos, J.L.; Méndez, R.; Mosquera-Corral, A. (2015). Filamentous bacteria existence in aerobic granular reactors. Bioprocess and Biosystems Engineering, 38(5): 841-851.

[8] Jenkins, D.; Richard, M. G.; Daigger, G. T. (2004). Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming. 3rd Edition. Lewis publishers (Michigan).

[9] Jenkins, D.; Richard, M.G., Daigger, G.T. (1993). Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming. 2nd Edition. Lewis publishers (Michigan).

[10] Kragelund C.; Yunhong, K.; Waarde, J.; Thelen, K.; Eikelboom, D.; Tandoi, V.; Thomsen, T.R.; Nielsen P.H. (2006). Ecophysiology of different filamentous Alphaproteobacteria in industrial wastewater treatment plants. Microbiology, 152: 3.003-3.012.

[11] Kragelund, C.; Nielsen, J.L.; Thomsen, T.R.; Nielsen, P.H. (2005) Ecophysiology of the filamentous alphaproteobacterium *Meganema perideoredes* in activated sludge. FEMS Microbiology Ecology, 54:111-122.

[12] Loy, A.; Maixner, F.; Wagner, M.; Horn, M. (2007). probeBase - an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. Nucleic Acids Research, 35:D800-D804.

[13] McLroy, S.; Lapidus, A.; Thomsen, T.R.; Haynes, M.; Lobos, E.; Huntemann, M.; Pati, A.; Ivanova, N.; Markowitz, V.; Verberg, S.; Woyke, T.; Klenk, H.P.; Kyrpides, N & Nielsen, P. (2015). High quality genome sequence of *Meganema Perideoredes* str. Gr1T and a proposal for its reclassification to the family Meganemaceae fam. Nov. Standards in Genomic Science. 10:23. doi: 10.1186/s40793-015-0013.

[14] Neilsen, P.H., Daims, H.; Lemmer, H. (2009). FISH Handbook for biological wastewater treatment. Identification and quantification of microorganisms in activated sludge and biofilms by FISH. IWA Publishing, Londres.

[15] Nielsen, J.L.; Christensen, D.; Kloppenborg, M.; Nielsen, H. P. (2003). Quantification of cell-specific substrate uptake by probe-defined bacteria under in situ conditions by microautoradiography and fluorescence in situ hybridization. Environmental Microbiology, 5(3): 202-211.

[16] Rodríguez, E.; Isac, L.; Fernández, N.; Zornoza, A.; Salas, M.D.; Serrano, S.; Pérez-Uz, B.; Arregui, L.; Calvo, P.; Estévez, F. (2008). Manual práctico para el estudio de grupos bioindicadores en procesos de fangos activos. Reed Business Information-Tecnología del Agua.

[17] Salvadó, H. (1990). Método rápido para el control del Bulking, técnica simple y rápida de conteo de microorganismos filamentosos. Tecnología del Agua, 67: 60-63.

[18] Seviour, R.J.; Liu, J.R.; Seviour E.M.; McKenzie, C.A.; Blackall, L.L.; Saint, C.P. (2002). The "Nostocoida limicola" story: resolving the phylogeny of this morphotype responsible for bulking in activated sludge. Water Science and Technology, 46:105-110.

[19] Seviour R.J.; Blackall L.L. (1999). The Microbiology of Activated Sludge. Kluwer Academic Publishers, U.S.A.

[20] Seviour R.J.; Nielsen, P.H. (2010). The current taxonomic status of the filamentous bacteria found in activated sludge plants. Microbial ecology of activated sludge. IWA Publishing, Londres.

[21] Thomsen, T.; Blackall, I.; Aquino de Muro, M., Nielsen, J. & Nielsen, P. H. (2006). *Meganema perideoredes* gen. No., sp. nov., a filamentous alphaproteobacterium from activated sludge. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56:1.865-1.868.