



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

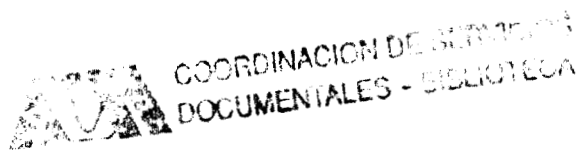
Fisiología de Flóculos de Lodos Nitrificantes

TESIS

Para Obtener el Grado de

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

Presenta



Felipe Martinez Orta

6 de noviembre de 1996



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

222261

Fisiología de los Flóculos de Lodos Nitrificantes

Presentada por

Felipe Martinez Orta

Jurado Formado por

Dr. Jorge Gomez Hernandez, Presidente

Dr. Ernesto Favela Torres, Secretario

Dr. Hervé Macarie, Vocal

M. en C. Florina Ramirez Vives, Vocal

6 de noviembre de 1996

Este trabajo lo dedico a las tres personas que me alientan a superarme día con día y ser una persona mejor. Para Silvia, Asael y Sandra Carolina

Agradezco a las personas que colaboraron de manera directa e indirecta en la realización de este trabajo y en especial al Dr. Jorge Gómez y al Dr. Ernesto Favela por sus acertados comentarios.

INDICE

	PAGINA
1.1 .-INTRODUCCION	2
1.2 .- MICROFLORA NITRIFICANTE	4
1.2.1 FISIOLOGIA Y BIOQUIMICA DE LA MICROFLORA NITRIFICANTE	5
1.3.- SISTEMAS NITRIFICANTES	8
1.3.1 REACTORES DE MEZCLA COMPLETA	8
1.3.2.- REACTORES DE BIOPELICULA.	10
2.- ESPONJAMIENTO (“Bulking”)	12
2.1.- VARIABLES QUE MIDEN LA FLOCULACION	14
2.2.- FENOMENO DE “BULKING” FILAMENTOSO	16
2.2.1.- <i>Sphaerotilus</i>	18
2.2.2.- Tipo 021N	19
2.2.3.- <i>Thiothrix sp.</i>	20
2.2.4.- Actinomicetos	21
2.2.5.- Algas Verdeazules	21
2.2.6.- Hongos	22
2.3.- PROCESO DEL FENOMENO “BULKING” NO FILAMENTOSO	22
3.- COMPONENTES EXOPOLIMERICOS DEL FLOCULO	24
3.1.- BIOSINTESIS DE EXOPOLISACARIDOS MICROBIANOS	27
3.2.- ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE LA FORMACION DE EXOPOLISACARIDOS	28
3.3.- PROTEINAS	29
3.4.- EFECTO DE LOS CARBOHIDRATOS Y PROTEINAS EXOPOLIMERICAS: ESTABILIDAD DEL FLOCULO	30
4.- BIBLIOGRAFIA	35
5.- ANEXO 1 (ARTICULO CIENTIFICO)	

PROLOGO

En la presente revisión, sobre la fisiología de los flóculos nitrificantes, se va a encontrar información sobre la microflora que se localiza en ese tipo de estructura. De tal forma, se presentará de manera sucinta los aspectos generales de los microorganismos nitrificantes más representativos. Asimismo, se hará una descripción de los aspectos bioquímicos y fisiológicos de la microflora nitrificante. La intencionalidad de la revisión es poner de manifiesto el hecho de que los microorganismos nitrificantes son, energéticamente poco eficientes, lo que se refleja en bajos rendimientos celulares, además de que cinéticamente crecen a velocidades muy bajas.

La rapidez del proceso es dependiente de la concentración celular. Si se desea rapidez y los microorganismos nitrificantes crecen a baja velocidad, durante el tratamiento de las aguas residuales, la microflora será "lavada" del reactor si los caudales son altos. Para minimizar esta limitante se han diseñado sistemas de retención y de concentración celular. Al respecto, se cuenta con varias alternativas de reactores de biopelícula que permiten que la nitrificación se lleve a cabo, pero en cualquier caso, las velocidades de proceso son aún lentas. Una de las alternativas que posibilita la concentración celular, es mediante el uso de reactores de mezcla completa con recirculación, sólo si la microflora flocula.

En los reactores de mezcla completa y recirculación, con respecto a los de biopelícula, es visible que las velocidades específicas de nitrificación son mayores, sin embargo, existen problemas de estabilidad del lodo, que los otros tipos de reactores no presentan. No obstante, la investigación que se ha realizado sobre estabilidad de los flóculos es aún escasa. Uno de los principales agentes de inestabilidad de los lodos floculantes nitrificantes son los episodios de esponjamiento ("bulking", en inglés). La información existente sobre las causas que propician este fenómeno, además de insuficiente, no ha aportado evidencias precisas que expliquen por qué se presenta el esponjamiento. Se

especula sobre las posibles circunstancias que originan el problema de inestabilidad, pero no se han aportado evidencias que lo confirmen. Como es necesario entender el fenómeno, durante la revisión se presenta información que aporta algunos datos que intentan determinar las causas del esponjamiento. Durante la lectura del texto se hacen comentarios, críticas y sugerencias a planteamientos propuestos en la literatura. Se hace hincapié a los métodos utilizados para evaluar la estabilidad de los flóculos nitrificantes y de las variables empleadas para medir los cambios de la estabilidad. Se describen al índice volumétrico de lodo, a la relación F/M (sustrato/microorganismo) y velocidad de sedimentación, señalándose los alcances y limitaciones de estas variables para utilizarlas como indicadores de estabilidad del flóculo.

Los flóculos son estructuras complejas constituidas de un consorcio microbiano y por material polimérico de características químicas diversas, estrechamente asociado a los microorganismos. Destaca la presencia de exopolisacáridos y proteínas exopoliméricas los que embeben a los microorganismos nitrificantes y heterótrofos. No se sabe cómo se producen, ni cómo se asocian entre si, pero es inherente a muchos microorganismos autótrofos. Tampoco se sabe qué función desempeñan los exopolímeros, pero desde el punto de vista del proceso nitrificante en el tratamiento de aguas residuales, resulta de la mayor importancia, ya que parece que está muy relacionada al tipo de componente y su concentración. Debido a esto se ha hecho necesario estudiar cuál de ellos juega el papel principal y aún no se sabe mucho la respecto. En esa parte del texto se presenta información sobre algunas de las particularidades químicas de los exopolímeros, encontrándose que en general, frecuentemente son formados a partir de 5 hexosas distintas. Se hace referencia a la posible existencia de exopolisacáridos con grupos funcionales como fosfatos y carboxilos que parece le confieren propiedades iónicas al flóculo. De ahí, se piensa que cationes como el calcio, magnesio o fierro pueden también ser componentes que contribuyen a la estabilidad del flóculo. Aunque se han hecho estudios cualitativos y cuantitativos de los exopolímeros, la formas en que se unen entre

ellos y los cationes no está aún entendida. Parece que la estabilidad de los flóculos está entonces vinculada tanto a la presencia de los exopolímeros, como de los cationes divalentes. Cuando esa asociación se modifica podría dar lugar al fenómeno de esponjamiento. Entender y definir esa relación contribuirá a determinar las circunstancias bajo las cuales la estabilidad flocular se pierde, o mejora, y posiblemente atacar los episodios de esponjamiento, lográndose mayor estabilidad mecánica de la estructura flocular. Lo anterior permitirá durante el tratamiento de aguas residuales en reactores de mezcla completa, el manejo de mayores velocidades de carga sin afectar la eficiencia del sistema por pérdida de biomasa nitrificante.

1.1 .-INTRODUCCION

Debido a que el hombre ha elegido los márgenes de los ríos y lagos para establecerse y desarrollar sus comunidades, ha traído como consecuencia que los mantos acuíferos gradualmente se contaminen. Hasta hace poco lo anterior no representaba un problema serio, ya que la naturaleza resolvía el problema de contaminación. Sin embargo, con la mayor industrialización y urbanización la alteración ambiental se hizo visible. Los grandes conglomerados humanos, alrededor de la naciente industria, trajo como consecuencia la utilización intensiva de los recursos naturales, sin moderación ni normas de control. Dentro de los sistemas dañados están los mantos acuíferos y se hace necesario su recuperación.

Dos son los contaminantes que se encuentran en mayor concentración en el agua, a saber, los compuestos que están formados por carbono y los que al degradarse liberan cantidades considerables de nitrógeno en forma de sales de amonio. Como ejemplo, se pueden citar a las industrias pesquera y maderera que liberan cantidades considerables de materia orgánica durante el proceso de elaboración de sus productos. Para eliminar esos compuestos carbonados y nitrogenados, se han diseñado diferentes metodologías, siendo las fisicoquímicas y microbiológicas las más frecuentes. Las primeras, en muchas ocasiones, no resuelvan el problema, ya que además de ser costosas sólo trasladan el problema del agua a otros ambientes. Por tal motivo, se han preferido a los sistemas microbianos, que utilizan al carbono y nitrógeno para su proceso respiratorio y crecimiento. Los compuestos de carbono se pueden descomponer a gases como el metano, y los que están constituidos por nitrógeno a nitrógeno molecular.

Una primera etapa para eliminar el amonio es transformándolo a nitrato, proceso lento que no resuelve por completo el problema de contaminación, ya que a pesar de no ser tan tóxico, como el amonio, el nitrato puede producir algunos trastornos a los organismos vivos (Azimi y Horan 1991). Por tal motivo, se requiere de un segundo paso

en donde el nitrato sea reducido a un compuesto que no sea contaminante. Al proceso de reducción se le conoce como desnitrificación, en donde, bajo condiciones anaerobias, el nitrato se reduce a nitrógeno molecular (Akunna y col., 1994). Este proceso puede ser utilizado para eliminar el nitrógeno de las aguas residuales, permitiendo nuevamente su uso en la agricultura u otras actividades sin que alteren el equilibrio de los ecosistemas. Del proceso global para la eliminación del nitrógeno amoniacal de las aguas residuales, el paso limitante está en la nitrificación.

1.2 .- Microflora Nitrificante

La nitrificación se lleva a cabo por medio de dos grupos bacterianos que pertenecen a la familia *Nitrobacteriaceae*. Debido a sus propiedades bioquímicas y fisiológicas pueden utilizar el amonio y oxidarlo a nitrito y nitrato. Al dióxido de carbono (CO_2) lo emplean como fuente de carbono (Watson y col, 1989). Son Gram negativos, presentan polimorfismo, su temperatura de crecimiento es de $25\text{-}30^\circ\text{C}$, el pH en el cual se desarrollan está entre 7.5-8.0, son aerobios estrictos y su tiempo de generación varia entre las 7 y 24 horas (Campbell, 1957). Se les denomina como bacterias litotróficas porque utilizan compuestos inorgánicos como fuente de energía. Un medio en el que las bacterias nitrificantes pueden crecer se describe en la Tabla 1.

Tabla 1 medio de cultivo para las bacterias litoautótroficas (Gomez y col, 1994)

Sustrato	g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.17
KH_2PO_4	1.40
MgSO_4	0.60
NaCl	1.00
NH_4Cl	0.95
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.70
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.40
NaHCO_3	0.33

La familia *Nitrobacteriaceae*, además de presentar un crecimiento escaso, es de velocidad específica lenta. Otra característica especial de los dos grupos microbianos es la sensibilidad marcada a la presencia de materia orgánica soluble, lo que las ubica como autotróficas obligadas, en consecuencia sólo pueden utilizar el carbono inorgánico (Prosser 1989, Watson y col. 1989, Bock y col. 1991). Se pueden aislar de diferentes ecosistemas, como el suelo, ríos, lagos y mares.

La familia se divide en dos grupos: en amonio oxidantes y nitrito oxidantes. Las bacterias amonio oxidantes, las que oxidan el nitrógeno amoniacal a nitrito, se agrupan según su forma, en los siguientes géneros, a saber, *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus*, y *Nitrosovibrio*, siendo *Nitrosomonas europaea* la especie más estudiada. *Nitrosolobus* se aísla frecuentemente del suelo, *Nitrospira* de suelos ácidos y a *Nitrosococcus* se le localiza fácilmente en el mar.

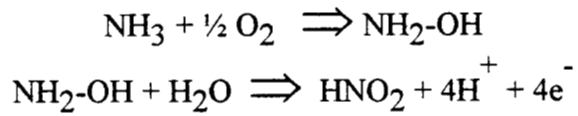
Las bacterias nitrito oxidantes se agrupan en 4 géneros, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrospina* y *Nitrobacter* siendo este último el género más estudiado (Watson y col, 1989) y generalmente se encuentran en el suelo, en tanto que los géneros restantes, en ecosistemas marinos.

1.2.1 Fisiología y Bioquímica de la Microflora Nitrificante

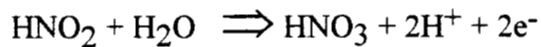
Aunque el concepto de metabolismo litotrófico de las bacterias amonio oxidantes, se inició hace más de 100 años, aún no se conocen todos los detalles de cómo se genera la energía de la oxidación del amonio a nitrito y nitrato. Casi toda la investigación se ha desarrollado utilizando *Nitrosomonas europaea* y la información generada se ha extrapolado a los demás géneros de la familia.

La reacción general de la oxidación del amonio a nitrito, se lleva a cabo en dos etapas. En la primera etapa el amonio se oxida a hidroxilamina. En la segunda, se oxida a nitrito en presencia de agua. El cambio de energía liberada de la óxido reducción hasta nitrito es

muy baja ($\Delta G^{\circ} = 65 \text{ KJ/mol}^{-1}$). La estequiometría de las reacciones que se llevan a cabo son:



En la segunda fase, de la reacción el nitrito formado se oxida completamente para formar nitrato, siendo el último paso de la reacción de la nitrificación (Bock y col. 1986). El cambio de energía libre de esta etapa oxidante es endergónica ($\Delta G^{\circ} = 83 \text{ KJ/mol}^{-1}$).



De la secuencia completa puede verse que el cambio de energía libre es muy bajo, lo que podría explicar los magros rendimientos celulares de biomasa nitrificante. La mayor parte de la energía producida en las dos etapas es utilizada básicamente en la fijación del dióxido de carbono (Prosser, 1989).

Suzuki y col. (1974) determinaron los valores de K_m de la relación $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ en extracto libre de células, valor que decrece drásticamente cuando aumenta el valor de pH. El intervalo evaluado estuvo entre 6.5 a 9.1, sin embargo el pH en donde se tiene un mejor crecimiento es cercano a 8. Esta conducta podría explicarse si se considera que al valor de pH básico, el equilibrio entre el ion amonio y el amoníaco, se encuentra desplazado hacia el amoníaco, por lo que se infiere que el sustrato para este tipo de bacterias es el NH_3 y no el NH_4^+ (Anthonisen y col, 1976). Asimismo, Suzuki y Kwok (1981), demostraron que las enzimas que llevan a cabo estos procesos de oxidación se localizan en la membrana bacteriana.

La primera enzima del grupo amonio oxidante que interviene en la oxidación, es la amonio monooxigenasa, quien transforma el amoniaco a hidroxilamina. El segundo paso se lleva a cabo, por un complejo enzimático denominado hidroxilamina oxidoreductasa, que se sabe se encuentra en el espacio periplásmico (Dispirito y col. 1985). El paso final donde el nitrito se transforma a nitrato, en las bacterias nitrito oxidantes, no se entiende aún bien, teniéndose sólo algunos indicios de que la reacción ocurre en el espacio periplásmico (Wood, 1986).

La utilización del CO₂ parece que se lleva a cabo por la vía reductiva del ciclo de Calvin. Mediante esta vía los microorganismos satisfacen sus necesidades de carbono (Smith y Hoare 1968; Kelly 1971). La familia *Nitrobacteriaceae* puede utilizar fuentes de carbono orgánicas, pero de modo muy limitado y siempre que la concentración sea baja, además de que existe especificidad hacia al tipo de fuente carbonada. En ocasiones se ha podido observar que la materia orgánica se consume en forma heterotrófica, pero la nitrificación se podría perder de manera irreversible (Bock, 1976; Bock y col, 1991)

1.3.- Sistemas Nitrificantes

Se han hecho avances importantes que han permitido mejorar la fisiología de la nitrificación, sin embargo, ni la velocidad ni el rendimiento actuales de la microflora nitrificante permitirían la recuperación de las aguas residuales. Una vía, con la cual se han podido superar algunas de esas limitaciones, es mediante el uso de sistemas de cultivo que propician la retención y acumulación de la biomasa microbiana. A continuación se hace mención a algunos de los reactores utilizados para la nitrificación biológica.

1.3.1 Reactores de Mezcla Completa

Uno de los reactores que se han usado, es el de tanque agitado o de mezcla completa, con alimentación en continuo. Este tipo de reactores se cree que no son adecuados para tratar efluentes de aguas residuales. Presentan algunos problemas en su operación y

estabilidad. En este tipo de reactores suele presentarse la pérdida de biomasa, no obstante que tiene la propiedad de flocular, aunque por el empleo de un sedimentador acoplado, el problema es menos grave. Existen diferentes diseños de estos reactores de mezcla completa, como el tipo quimiostato modificado o el tipo Husmann (Rudling y Solyon 1974). Este último tiene un diseño sencillo (Figura 1), en donde destacan, tanto el reactor principal, como el decantador. Al reactor principal se le puede adaptar un impulsor que mejora el transporte de masa, siendo en el oxígeno en donde mayores mejoras se logran. La recirculación de la biomasa se realiza por medio de inyección de aire. La mayor limitación se encuentra en el manejo de los caudales, los que no pueden ser muy grandes, a riesgo de que en el decantador se genere turbulencia y se pierda biomasa (usualmente llamado lavado del reactor) por el efluente situado en el decantador.

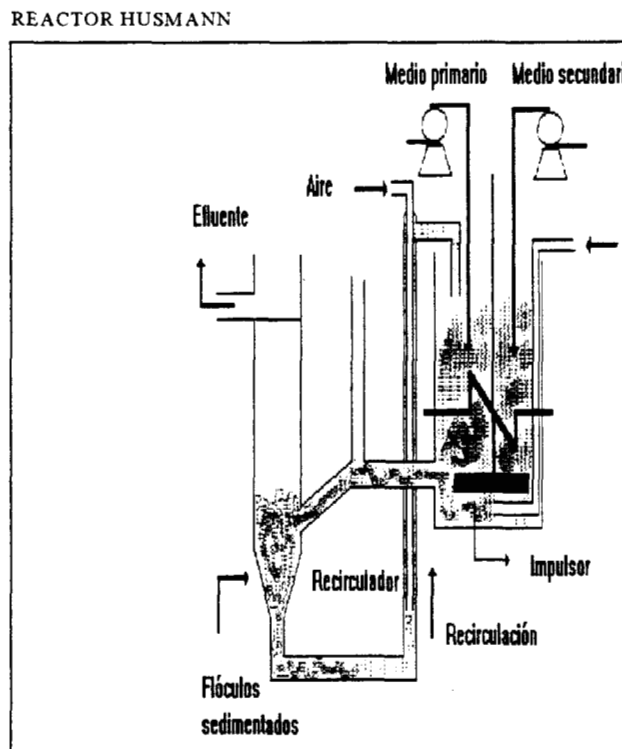


Figura 1 . Reactor tipo Husmann. Se muestra las partes principales que lo forman, el reactor y decantador.

Como estos reactores basan su operación en la capacidad de los microorganismos nitrificantes de sedimentar por medio de la floculación. Sin embargo, los índices de sedimentabilidad de las bacterias puede no ser significativa y convertirse en otro factor de lavado de reactor. Lo anterior implica que los tiempos de residencia hidráulico sean de varios días para evitar que en el efluente se arrastre a los microorganismos. Hay otros factores que pueden hacer que la capacidad floculante se modifique negativamente y no se sabe bien que lo origina. Algo que cabe destacar es que este tipo de reactores tienen una alta actividad específica que permite manejar caudales muy concentrados.

1.3.2.- Reactores de Biopelícula.

Entre los sistemas nitrificantes que utilizan biopelículas, se pueden encontrar los filtros percoladores (“trickling filter”, en inglés), el de discos rotatorios biológicos, el filtro sumergido o el de lecho fluidificado, entre otros. Todos estos reactores nitrificantes tienen en común que la biopelícula se forma sobre un soporte inerte, en donde los microorganismos se adhieren fuertemente y las pérdidas de biomasa son casi nulas. Según el sistema, la aireación se puede hacer de diversos modos, pero siempre debe ser a saturación. De hecho, esto último es en gran medida la principal limitación para el uso de los reactores de biopelícula. Asimismo, en todos ellos la actividad específica nitrificante es baja, debido a que sólo la capa más superficial es microbiológicamente activa, en consecuencia, el tratamiento de aguas residuales se circunscribe a influentes muy diluidos. Cuando la concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH_4^+) es relativamente alta (80 mg $\text{N-NH}_4^+/\text{l}$), los tiempos de retención hidráulica es de varios días (3 a 5). Una ventaja, respecto al reactor de mezcla completa, es que la actividad nitrificante de la biopelícula es estable. Un factor relevante en la operación de los reactores de biopelícula es el mantenimiento, ya que si no se controla el crecimiento microbiano, los espacios del soporte inerte, en el filtro percolador, sumergido o de discos, se satura y el caudal de

entrada se ve severamente afectado (Bishop y Kinner 1986). Otro factor adicional que debe considerarse en los reactores es el tiempo que toma en formarse la primer capa, el que puede llevar hasta 12 semanas (Trulear y Characklis, 1982; Eighmy y col. 1983). La velocidad de las formación de las biopelícula depende en gran medida de las condiciones ambientales (temperatura, pH, y la concentración del sustrato), aunque también las características fisiológicas de la biomasa microbiana pueden influir marcadamente.

A la fecha existen aguas residuales que contienen concentraciones muy altas de $N-NH_4^+$ que deben ser tratadas, pero los sistemas biopelícula sólo pueden emplearse para influentes diluidos. Parecería que los indicados son lo de mezcla completa, pero es necesario hacer más estudios de fisiología de los microorganismos nitrificantes y sobre la estabilidad floculante.

2.- ESPONJAMIENTO (“Bulking”)

Uno de los principales problemas en la sedimentabilidad de los lodos activados está representado por el fenómeno de esponjamiento (FB), ya que bajo un episodio de estos el reactor nitrificante pierde la sedimentabilidad y el lodo. El fenómeno generalmente ocurre sin causas aparentes, sólo se observa que el lodo flota y su actividad respiratoria nitrificante disminuye, siendo el lavado del lodo por el efluente, el problema principal, porque el reactor se pierde (Pipes 1978; Forster, 1985).

El esponjamiento de los lodos activados es un tema que muchos autores han descrito. Se menciona que son dos los tipos principales, el FB filamentoso y el FB no filamentoso.

Se ha observado frecuentemente que el FB va normalmente asociado a la formación de espuma, lo que eleva el mal funcionamiento del reactor (Jenkins, 1992). El FB se puede definir de varias maneras, por ejemplo, Eikelboom y van Buijsen (1981) lo definen como un lodo que pobremente se compacta, y se cree que la causa es el crecimiento excesivo de microorganismos filamentosos, o bien el zooglear. Para Jenkins y col. (1986), basándose en el crecimiento de los microorganismos filamentosos, el FB se define como

la formación de una macroestructura flocular que flota debido a cambios en su densidad, dando lugar a un floculo de gran volumen. Actualmente, se define el FB como el estado en la que el grado de sedimentabilidad del lodo es baja, con una actividad nitrificante deficiente (Novak y col., 1993). Por el momento no se tiene una explicación clara de por qué ocurre el FB, y se han tratado de determinar las causas que pueden desencadenar ese comportamiento. Dentro de los posibles factores desestabilizantes, o promotores del esponjamiento, se mencionan el nivel bajo de oxígeno, o aireación, en el reactor (Hanaki y col. 1990). Otro factor puede ser la concentración del lodo en el reactor, argumento muy discutido, ya que asume un número elevado de microorganismos, contra la baja disponibilidad de sustrato. Lo anterior no ha podido ser determinado, pero cualquiera de las posiciones mencionadas son probables agentes causales que modifican la estabilidad del floculo (Pipes, 1978). Uno de los factores que más se ha discutido, es la concentración de materia orgánica en el reactor floculante. Autores como Steinmüller y Bock (1976), señalan que la materia orgánica afectan negativamente la nitrificación, debido a que la disminuye el consumo del CO_2 , por una posible inhibición del ciclo de Calvin (Smith y Hoar, 1968; Mendez-Pampin y col, 1996). Otro aspecto importante es el aumento de la concentración de N-NH_4^+ en el influente, ya que se modifica la C/N favoreciendo la aparición del FB por un probable crecimiento excesivo de la microflora heterótrofa asociada al consorcio del lodo. No se sabe aún bien cómo se produce la modificación de la estabilidad del lodo nitrificante cuando aumenta la carga de N-NH_4^+ .

2.1.- Variables que Miden la Floculación

Existen diferentes variables que se han instrumentado para medir el estado en el cual se encuentra el lodo, a saber:

A).- Por medio de la velocidad de sedimentación, que es el cambio de la sedimentabilidad del lodo activado, por unidad de tiempo. En la práctica las medidas se toman cuando han transcurrido 30 minutos.

B).- A través de la relación F/M, la que define la actividad del lodo nitrificante en relación al crecimiento de los microorganismos, en términos de la materia orgánica asimilable y se expresa por la siguiente ecuación.

$$F/M = Q (L_o - L_e) / (V f S_a)$$

Donde Q es el caudal (m^3/d); ($L_o - L_e$) la demanda química de oxígeno de entrada y salida (concentración de materia orgánica). f es la relación porcentual de sólidos suspendidos volátiles (SSV, g/l) y sólidos suspendidos totales (SST= S_a , en g/l); V es el volumen del reactor (m^3). La relación F/M, en la actualidad, ha sido utilizada por algunos autores para determinar las condiciones de sedimentabilidad del lodo y puede pronosticar episodios de FB (Diegger y col, 1985).

C).- Por medio del índice volumétrico del lodo (IVL), que se define como el volumen que ocupa un gramo de lodo después de transcurridos 30 minutos, reflejando el comportamiento del lodo y su grado de sedimentabilidad (Goodwin y Forster, 1985; Echeverría y col, 1992; Novak y col, 1993). Valores menores que 100 ml/g se consideran como aceptables y valores por arriba de éste, son indicadores de episodios de FB. El IVL puede ser indicativo de la estabilidad del lodo, ya que cuando se presenta el FB, el tamaño del floculo cambia, así como su densidad, lo que origina que flote y se pierda la biomasa microbiana por el efluente. Cuando las condiciones de operación hidráulicas y fisiológicas se normalizan, el lodo vuelve a sedimentar (Goodwin y Forster, 1985 o Novak y col, 1993).

Los parámetros descritos se utilizan para saber el estado del lodo, pero la mayoría de los autores toman como parámetro principal al IVL, ya que es fácil de medir y se ha visto que puede reflejar las propiedades del lodo de forma directa. Además de los ya factores desestabilizantes del lodo mencionados, algunos estudios indican que también la

concentración de iones divalentes como fierro, calcio, magnesio, así como el aumento de carbohidratos exopoliméricos (Forster, 1971) pueden modificar el IVL.

2.2.- Fenómeno “Bulking” Filamentoso

Parece ser que el FB se da por el excesivo crecimiento de los microorganismos filamentosos (Jenkins col. 1986), no obstante que son parte importante en la estructura del floculo, llegándose a pensar que es el cemento mediante el cual se aglutina el floculo (gránulo, para ser preciso). En la actualidad se ha visto que no sólo las bacterias filamentosas causan el FB, sino que también hay otros microorganismos que pueden causar el mismo fenómeno, como pueden ser los hongos, algas verdeazules y actinomicetos Eikelboom (1975), Sezgin y col. (1978), Jenkins y col. (1984), Chudoba y col. (1985) y Poon y col. (1986), entre otros autores, refieren que un crecimiento excesivo de bacterias filamentosas, no necesariamente se traduce en FB, sino que también puede originar el fenómeno de efluente turbio (“pin point”), es decir, un aumento de la concentración de los sólidos suspendidos, además de la formación de espuma (Khan y Forster, 1990 y Foot y col., 1994). En ocasiones el efluente turbio puede ser el preámbulo del FB.

Se han determinado alrededor de 20 a 30 tipos de bacterias filamentosas distintas que pueden formar parte del lodo, pudiéndose aislar algunas en forma pura. Las observaciones al microscopio no dan diferencias claras de los diferentes tipos. Farquhar y Boyle (1971), refieren el hallazgo de 15 tipos de bacterias filamentosas en donde los géneros *Sphaerotilus*, *Thiotrix* y *Vitreoscilla* fueron las bacterias que se encontraron con mayor frecuencia (Tabla 2). Eikelboom (1975) examinó 1000 muestras de 200 plantas tratadoras de agua residuales con FB, encontrando 24 géneros diferentes de bacterias filamentosas, en donde *Sphaerotilus natans* fue el principal causante del FB. Los mismos autores observaron que las bacterias filamentosas tenían una vaina formada

principalmente por lípidos, utilizando la enzima lisosima para evidenciarla con mayor precisión.

Tabla 2. Principales microorganismos aerobios filamentosos que provocan el FB en lodos activados.

Microorganismo	Características
Filamentoso	Morfológicas
<i>Sphaerotilus sp.</i>	Gram negativo, no presenta movilidad, mide entre 5 y 6 micras .
<i>Thiothrix sp.</i>	Gram negativo, mide al rededor de una micra, presenta gránulos en su citoplasma.
<i>Micothrix parvicella</i>	Gram positiva, sus células miden 1.8 micras de largo.
<i>Beggiatoa sp.</i>	Gram negativas sus células miden menos de una micra, presenta depósitos de azufre.

Se han determinado un gran número de bacterias filamentosas, pero solo algunas son las que se han demostrado provocar el FB. A continuación se describen los géneros que se cree son los responsables principales del FB en lodos filamentosos.

2.2.1.- Género *Sphaerotilus*

Es la bacteria filamentosa que más se ha aislado en el FB y es Gram negativa, de forma alargada que contiene depósitos de azufre en la célula. El género y especie más común es *Sphaerotilus natans*, aunque se puede confundir con otras especies, como *S. hialina* y *S. discophorus*. Esta última se considera la más importante en los cambios del índice volumétrico del lodo.

Se postulan dos supuestos que pueden explicar el por qué *Sphaerotilus natans* puede ser la bacteria predominante en los FB.

1).- El crecimiento de esta bacteria filamentosa, esta dada por la relación área /volumen. En estos términos *S. natans* tiene una mayor área de contacto, compitiendo con ventajas cuando se tiene baja concentración de materia orgánica soluble, o baja concentración de oxígeno disuelto, lo que frecuentemente existe y es una limitación importantes en las aguas residuales (Michael y col. 1985).

2).- El otro factor es la relación C/N o C/P, ya que dependiendo de la relaciones de estos elementos, puede almacenar nutrientes como gránulos de poli-β-hidroxibutirato al cual utiliza cuando las condiciones son poco favorables para el resto del consorcio. Así se puede explicar su crecimiento excesivo y provocar el FB

2.2.2.- Tipo 021N

Es una bacteria gran negativa con gránulos intracelulares, algunos de los cuales están formados por sulfuro. Chudoba y col. (1973), estudiaron el efecto de la interacción de esta bacteria con otros géneros en el proceso del FB filamentoso. El tipo 021N , se cree que causa alrededor del 19 % de los procesos de esponjamiento en las plantas de tratamiento de agua en lo Estados Unidos de Norteamérica. Estos tipos de bacterias ocasionan cambios severos en el IVL debido a su mayor crecimiento, llegando hasta valores 500 ml/g (Michael y col, 1985). La 021N puede encontrarse sola, o bien combinada con otras bacterias filamentosas y suele crecer en aguas residuales con alto contenido de nitrógeno el que, al parecer, favorece su crecimiento.

2.2.3.- *Thiothrix* sp.

Es una bacteria Gram negativa, siendo el sulfuro un factor limitante para su crecimiento. Se asume que es la responsable del 12 % de los casos de esponjamiento en las plantas tratadoras de aguas residuales de Estados Unidos de Norteamérica, teniendo características similares a la bacteria 021N (Farquhar y Boyle 1972).

2.3.1.- Actinomicetos

Pipes (1978) encontró que estos microorganismos causan un pequeño porcentaje de los casos de FB, ya que favorecen el aumento en el índice volumétrico del lodo, aunque no mayor que 200 ml/g. Forman colonias compactas, con un alto contenido de ramificaciones. En el reactor se observa un aumento en la viscosidad, con la formación de espuma de color café. El género y especie que más se ha aislado en los FB es *Nocardia amaraes*.

2.3.2.- Algas Verdeazules.

Las alga verdeazules son células fotosintéticas que utilizan la luz para poder crecer. Generalmente se encuentran en forma libre, pero en el caso de los lodos nitrificantes se pueden encontrar asociadas con otras bacterias. Eikelboom (1975) encontró que algunas algas en altas concentraciones, como *Lyngbya*, pueden ser capaces de modificar la sedimentabilidad del lodo, aunque no suele ser muy común. Aparte de *Lyngbya*, se han encontrado otros dos géneros capaces de modificar la sedimentabilidad del lodo, esto es, *Phormidium* y *Schizothrix*, aunque no se sabe que factores contribuyen al crecimiento de esta algas. Cuando el crecimiento de las algas es excesivo no se tiene todavía una forma de cómo evitar los problemas de FB en los reactores nitrificantes.

2.3.3.- Hongos

Estos se dividen en hongos macroscópicos y microscópicos, son células que forman el micelio, y en el caso de las levaduras, pseudomicelio. Son microorganismos heterótrofos y se pueden reproducir en forma sexual o asexual, encontrándose en la mayoría de las ocasiones, formando el lodo filamentoso sin visos de FB. Eikelboom (1975) observó hongos microscópicos en los lodos activos y encontró que los más frecuentes fueron *Trichosporun*, *Geotrichum*, *Candida* y *Rhodotorula*. Son muy raros los casos de FB causados por estos hongos, ya que necesitan de valores de pH ácidos para crecer. En los reactores nitrificantes generalmente se tiene un pH 7.8, lo que hace difícil su crecimiento.

2.4.- Proceso del Fenomeno “Bulking” no filamentoso

El flóculo no-filamentoso, como su nombre lo indica, no contiene bacterias filamentosas. Se le conoce también como crecimiento zooglear. Las bacterias nitrificantes que forman el flóculo presentan frecuentemente pleomorfismo. En el flóculo, además de las bacterias nitrificantes, se encuentran protozoarios y en ocasiones, algunos tipos de algas que se encuentran en muy baja concentración. En este tipo de lodo, también se presenta el FB, que se caracteriza por una disgregación de los sólidos (Novak y col. 1993; Jenkins 1992). Se acompaña de la separación de las bacterias nitrificantes, observándose al mismo tiempo turbiedad en el decantador (“pin-point”), precursora del FB. Durante este período se observa la formación de espuma, característico de esta etapa. A este FB no filamentoso también se le conoce como “bulking” viscoso, debido a que se presenta una especie de jalea (Jenkins y col. 1986) o esponjamiento zooglear debido al crecimiento de microorganismos zoogleares conocidos como bacterias poli-P. El fenómeno se puede definir como el estado donde la sedimentación y la actividad del lodo es baja, así como

su compactación, con una pobre actividad nitrificante. Dado que la compactación del lodo es un factor importante, los componentes del floculo deben encontrarse en relación íntima. En esas condiciones el lodo presenta una buena estabilización.

Las bacterias de crecimiento zooglear secretan compuestos exopoliméricos, los que probablemente son los causantes de la formación de espuma y disminución de la estabilidad del floculo en los periodos de esponjamiento del lodo. Aunque realmente no se conoce qué es lo que desencadena los episodios de FB, se han considerado algunos puntos de vista como los siguientes.

A).- La composición del agua residual puede ser un factor importante para el crecimiento excesivo de la zooglea. Uno de los componentes que ha demostrado ser importante e el crecimiento de la zooglea, es el ácido oleico disuelto en el agua residual, ya que su presencia influye marcadamente en la desestabilización del floculo (van Leeuwen 1988).

B).- Una concentración alta de lodo, acompañada de una disminución de nutrientes, como el nitrógeno, fósforo, o de algunos micronutrientes como el hierro pueden ser los factores que desencadena el FB, dado que son parte inherente del floculo (Wood y Tchobanoglous 1974).

C).- Una disminución de oxígeno disuelto en el sistema, lo que puede provocar un crecimiento excesivo de bacterias poli-P como *Acinetobacter sp.*, quien se piensa es la causante principal de los problemas de sedimentación. Con el crecimiento excesivo se presenta una sobreformación de material mucilaginoso (Stichová 1990).

Para medir las condiciones en que se encuentra el lodo, se emplean los mismos criterios que los utilizados en el lodo filamentoso, siendo el índice volumétrico del lodo, el más común. Valores por debajo de 100 ml/g se consideran valores normales, por encima de estos, se considera que existe un procesos de esponjamiento (Magara y col 1976),

aunque la regla debe tomarse con reserva. Otra manera de medir las condiciones de sedimentabilidad del lodo, es por medio de la relación F/M, en donde valores de 0.25 a 1, al día, se considera que el reactor se encuentra en un episodio de esponjamiento (Diagger y col, 1985). Los valores de la relación F/M se relacionan con el tiempo de residencia hidráulica, que es otro parámetro a considerar en muchos FB.

Como se mencionó, son muchas las variables que influyen y modifican la estabilidad del lodo, pero nadie ha podido comprobar cómo (o qué) se lleva a cabo la desestabilización, por lo que se hace necesario investigar de manera más detallada el papel de los factores distintos que pueden afectar al lodo.

3.- COMPONENTES EXOPOLIMÉRICOS DEL FLÓCULO

Una gran número de microorganismos producen exopolisacáridos. Muchos de ellos son sintetizados para formar estructuras celulares como la cápsula y que pueden ser liberados al ambiente en forma de moléculas extracelulares, cuando se forman en exceso. Los diferentes polímeros pueden variar considerablemente en su estructura química, lo que influirá en su arreglo tridimensional. Los compuestos exopoliméricos han tomado mucha importancia desde hace tiempo, ya que algunos de ellos son producidos por microorganismos de interés médico.

Hoy en día, con los avances tecnológicos, se han podido dilucidar la estructura de una gran cantidad de polisacáridos. Lo que no ha sido fácil es identificar las rutas metabólicas por las cuales se sintetizan los polisacáridos, sólo se sabe la forma de cómo se lleva a cabo la síntesis de azúcares como de D- glucosa, D-manosa, D-galactosa y ácido D-glucurónico. Los monosacáridos se enlazan para formar moléculas de mayor peso molecular que pueden ser de valor comercial, como las dextranas, polisacárido compuesto por una sola clase de monosacáridos (conocidos como homopolímeros). Las

bacterias que la producen utilizan sacarosa como sustrato, aunque en su ausencia, la bacteria puede crecer con otro tipo de azúcar como sustrato y a partir de ésta, formar los exopolímeros. Existen algunos géneros de bacterias que pueden formar dextranas, como *Leuconostoc* y *Streptococcus*.

Hay un grupo de bacterias que puede utilizar un tipo específico de monosacárido como sustrato y, no obstante, producir polisacáridos que en su estructura contengan más de dos monosacáridos diferentes por tener la capacidad de isomerizar la fuente de azúcar. (heteropolisacárido). Para esas bacterias, la fuente de carbono no es determinante en la producción de un tipo específico de polisacáridos, pero sí dependiente de la fuente de nitrógeno, la que ha demostrado influir en el tipo y producción del polisacárido (Sutherland y Ellwood 1979). Existen otros grupos de microorganismos que con diferentes fuentes de carbono forman exopolisacáridos que, en su estructura, únicamente contiene un sólo tipo de monosacárido, a saber, homopolisacáridos, los que se forman intracelularmente y se secretan al ambiente extracelular.

3.1.- Biosíntesis de Exopolisacáridos Microbianos.

Los exopolisacáridos, conocidos como homopolisacáridos, están formados por unidades estructurales repetidas y son sintetizadas por una gran variedad de células, tanto procarióticas, como eucarióticas. De los homopolisacáridos, aunque de composición simple, no es fácil establecer el tipo de sus enlaces, así como su estereoquímica. A los heteropolisacáridos, por ser químicamente más complejos, es más difícil dilucidarles su estructura, ya que los monosacáridos que lo forman son diferentes. En los heteropolisacáridos es relevante conocer su tamaño, el número de ramificaciones y la posición de los enlaces entre los monosacáridos (Sutherland 1972). Un ejemplo de un exopolisacárido microbiano es el producido por la bacteria alginata, heteropolisacárido

constituido por dos monómeros diferentes, a saber, el ácido D- manurónico y el ácido L- glucurónico, ambos monosacáridos con un grupo O-acetil (Figura 2).

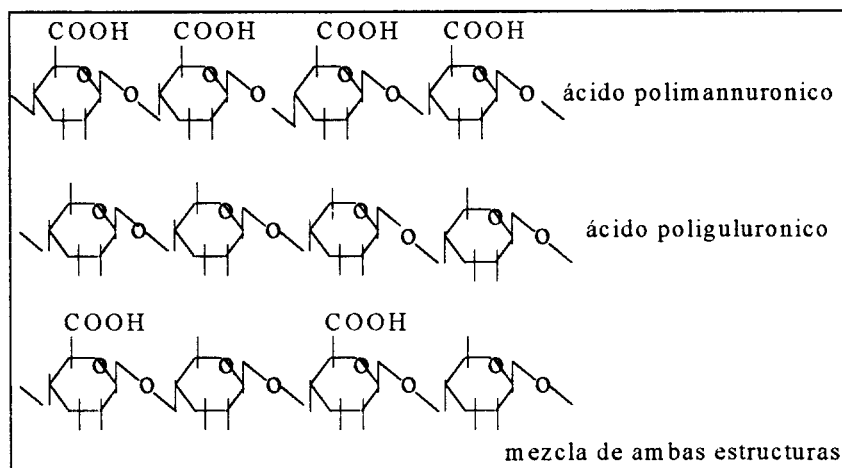


Figura 2.- Exopolisacáridos heterogéneos estructurales producidos en la bacteria alginata.

3.2.- Aspectos Fisiológicos de la Formación de Exopolisacáridos.

La mayoría de los exopolisacáridos producidos por los microorganismos se pueden estudiar desde el punto de vista de los monómeros o dímeros de carbohidratos utilizados para su síntesis. También merece atención la fuente de nitrógeno adicionada al cultivo, como las sales de amonio, o bien los aminoácidos. Se ha visto que cuando existen limitaciones en la fuente de carbono, los microorganismos pueden producir polisacáridos a partir de aminoácidos, o de algún otro como CO₂, y fijar al nitrógeno atmosférico, como fuente de nitrógeno (Sutherland 1979).

Elementos como el fósforo, sulfuro o potasio, entre otros pueden intervenir en el metabolismo y regular la producción de los polisacáridos, observándose que cuando estos se encuentran en baja concentración, la producción de los exopolisacáridos es escasa, lo que probablemente se deba a un transporte deficiente. Se cree que es debido a

la competencia entre el potasio y amonio, pero no hay evidencias que permitan afirmarlo. De cualquier manera, lo interesante es saber cómo influyen en la formación de los exopolisacáridos. Algunos resultados preliminares apuntan que son importantes para la producción iones como Fe^{2+} , Mg^{2+} y Ca^{2+} , los que pueden fungir como cofactores enzimáticos. Asimismo, se ha evidenciado que el Fe^{2+} y el Ca^{2+} , tienen un papel destacado en el metabolismo como estimuladores en la producción de los exopolisacáridos, activando las enzimas que intervienen en su síntesis (Corpe 1964).

La aireación es otro factor que puede ser importante para que el sustrato se metabolice, parcial o totalmente. Cuando es parcial da como resultado un cambio metabólico del proceso respiratorio. Un problema asociado, es la transferencia del oxígeno al medio, que se ha convertido en un problema (aún no resuelto) tecnológico, por su baja solubilidad en el agua.

Las bacterias que utilizan el CO_2 como fuente de carbono y al nitrógeno atmosférico como fuente de nitrógeno, el molibdeno es un elemento importante, dado que concentraciones bajas de éste y limitaciones de nitrógeno afectan la síntesis de exopolisacáridos. Igualmente, existen microorganismos que pueden utilizar dos fuentes de carbono simultáneamente, sin observarse crecimiento de tipo diaúxico, y forman un hetero-exopolisacárido (Sutherland y Ellwood 1979).

Se han hecho algunos trabajos para saber la importancia del calcio, ya que como se ha mencionado, actúa como cofactor de enzimas que intervienen en la biosíntesis de polisacáridos. Para conocer qué papel juegan en la formación de los exopolímeros, se procedió a sustraerlos con la ayuda de un quelante, como el EDTA. El resultado observado fue que la deficiencia del calcio, indujera la producción de carbohidratos de características químicas distintas. La consecuencia fue que los exopolisacáridos formados

no permitieron que el flóculo tuviera consistencia, además de que la velocidad de sedimentación se modificó (Corpe 1964).

Hay microorganismos que introducen grupos fosfato a los exopolisacáridos, que se favorece cuando hay un aumento considerable del fósforo disponible (Sutherland 1977). Cuando eso sucede mejora la velocidad de sedimentación. Sin embargo, no es muy recomendable alimentar cargas altas de fosfato a un reactor nitrificante.

Existen otros factores como el pH y la temperatura, que pueden afectar la formación de los exopolimeros. El efecto de han sido observados, tanto en cultivos en lote y que pueden ser extrapolados al cultivo en continuo, pero debe realizarse el trabajo respectivo para confirmar que ocurre de manera similar en ambos casos. Debe recordarse que los dos tipos de cultivo establecen condiciones fisiológicas distintas.

3.3.- Proteínas

Las proteínas están formada por aminoácidos, aunque no de forma exclusiva, puesto que existen algunas que pueden incluir en su estructura carbohidratos y lípidos. Los pesos moleculares entre ellas son distintos. La proteína más pequeña puede tener con un peso 12 KD, y la más grande ser de hasta 650 KD, aunque es posible que algunos complejos proteínicos (como las cuaternarias) tengan un peso mucho mayor. Las proteínas tienen diferentes funciones, pudiéndose mencionar al transporte, estructurales en organelos, de defensa y proteínas que tienen actividad catalítica. Las son específicas según la célula, si dejar al margen la influencia de las condiciones fisiológicas del cultivo. Dependiendo de su función, las proteínas pueden ser intracélulares y extracélulares las que son secretadas al ambiente de la célula.

3.4.- Efecto de los Carbohidratos y Proteínas Exopoliméricas: Estabilidad del Flóculo

Las bacterias nitrificantes autotróficas se asocian con microorganismos heterotróficos, que inducen a la formación de biomoléculas como los exopolisacáridos proteínas o lípidos forman el flóculo. Se ha indicado antes que durante el proceso de formación de las macromoléculas, los iones divalentes calcio fierro y magnesio son necesarios para la formación y estabilidad de los flóculos. En los lodos activados nitrificantes la floculación es necesaria por lo que un gran número de autores se han abocado al estudio de los exopolímeros que estructuran el flóculo (Goodwin y forster, 1985., Horan y Eccles, 1986., Novak y col, 1993).

Para estudiar la composición bioquímica del flóculo no filamentoso se han realizado diversos estudios, utilizándose diferentes métodos para disgregar el flóculo. Sato y Ose. (1980) para determinar los exopolimeros del flóculo utilizó hidróxido de sodio a diferentes concentraciones (1N y 2N) y observó el efecto que tiene éste en su disgregación. Sin embargo, los resultados dejan algunas dudas, ya que la concentración de la base utilizada fue excesivamente alta. Goodwin y Forster (1985) utilizaron diferentes temperaturas para disgregar el flóculo, concluyendo que a 80⁰C se obtuvo la mayor desagregación del flóculo. Horan y Eccles (1986) utilizaron un método de extracción de exopolímeros mediante una combinación de temperatura con una base. Los resultados obtenidos parecen indicar que el método es una buena opción. Urbain y col, (1993) y Jorand y col, (1995) utilizaron ultrasonido para disgregar el flóculo, logrando determinar con algún detalle el tipo de componentes de los exopolímeros, sin embargo, no se puede descartar que haya habido ruptura celular y que los productos de la lisis se confundieran con los exopolisacáridos.

Sato y Ose. (1980) observaron que la composición química de los exopolímeros se constituye principalmente de carbohidratos, proteínas lípidos, ácidos nucleicos, pero no indican cuál es el papel de cada uno de los componentes y solo mencionan que son

necesarios en la estabilidad del flóculo. Asimismo, Wahlberg y col. (1992) refiere que los exopolímeros son medulares para la función y estabilidad del flóculo, pero tampoco hace mención a como interactúan estos compuestos para formar la estructura tridimensional, sólo indica que los compuestos de mayor importancia e influencia son los carbohidratos y las proteínas. Se ha encontrado que los exopolisacáridos intervienen en la estabilidad del flóculo, ya que cuando se presentan cambios en su concentración el IVL se modifica, sea mejorando o disminuyendo las características mecánicas del agregado. Horan y Eccles (1986) determinaron la composición de los exopolisacáridos y vieron que están principalmente formados por 5 monosacáridos (glucosa, galactosa, manosa, ácidos glucurónico y galacturónico), pero no dieron indicios sobre la forma en que están unidos, ni el tipo de estructuras tridimensional de estos. Al respecto, Goodwin y Forster (1985), indicaron que variaciones en la concentración de los exopolisacáridos afectan el IVL.

Parece ser que los exopolímeros que se encuentran en mayor concentración son los carbohidratos, y en segundo lugar las proteínas. Los análisis realizados se llevaron a cabo en reactores que están en condiciones estacionarias, pero siempre fueron medidas puntuales, aisladas, no sistemáticas, durante el régimen estacionario. En principio todo hace suponer que tanto cualitativa, como cuantitativamente, la composición química es constante, pero se hace necesario confirmarlo.

Con frecuencia es fácil encontrar información contradictoria en relación a cual de los exopolímeros confiere mayor estabilidad al flóculo. Las discrepancias podrían ser debidas a los métodos de medida. Por ejemplo, se cree que los carbohidratos son los mas importantes en la formación del flóculo, lo que se respalda en estudios en donde se observa que cambios en la concentración de estos, resulta en un aumento en el IVL, lo que podría ser contraproducente si se considera que el incremento excesivo del IVL trae como consecuencia posibles episodios de FB (Novak y col, 1993).

Las proteínas son el otro exopolímero importante, pero casi nada se sabe de su papel en la estabilidad del agregado. No se sabe si tiene alguna función, pero parece ser que influye en la conformación del floculo. Todavía no se ha determinado cuales son los tipos de proteínas presentes en el agregado, sólo se menciona como uno de los componentes mayoritario en el floculo. Autores como Urbain y col (1993) señalaron la existencia de lípidos y ácidos nucleicos como los otros tipos de biomoléculas, que forman parte del floculo, mencionando también la presencia de iones divalentes como calcio, magnesio y hierro. Cabe señalar que, con respecto a las proteínas y polisacáridos, normalmente se encuentran en menor concentración en el floculo. Se sabe que son importantes los iones divalentes tienen una alta afinidad por los exopolímeros, pero no se tiene evidencia a cuáles de los exopolímeros (Forster y Lewin, 1972; Forster y Dallas-Newton, 1980). Se piensa que los iones divalentes, con carga positiva interactúan con los grupos que contienen carga negativa de los carbohidratos y de las proteínas exopoliméricas para formar la estructura del floculo, aunque es necesario realizar más estudios que demuestren este supuesto. Estudios recientes (Martínez, 1996) proponen un modelo de estructura del floculo que incluye, tanto las observaciones de resultados previos, como nuevas evidencias (Figura 3).

En relación a los iones divalentes, Eriksson y Alm (1991), observaron que el EDTA afectaba la actividad y estabilidad del lodo y vieron que, a medida que aumentaba la concentración del EDTA, aumentaba también la concentración de carbohidratos y proteínas exopoliméricas extraídas al floculo, lo que puede ser indicativo que los cationes divalentes se enlazan con los exopolímeros. No obstante, todavía no se puede saber como están unidos los cationes a los exopolímeros.

Aunque a los carbohidratos se les relaciona con los episodios de esponjamiento, no se descarta a las proteínas como posibles responsables de ese fenómeno. Además es probable que intervengan en la formación de espuma (Foot y col., 1994). No se tienen

datos precisos de la concentración de los carbohidratos durante el fenómeno de esponjamiento, pero es difícil asumir que formen espuma. Otros compuestos que pueden formar espuma, y que se encuentran constituyendo el flóculo, son los lípidos. Sin embargo, si se considera que en la nitrificación se lleva a cabo a pH cercano a 8 (condiciones de saponificación de los ácidos grasos), pudiera ser que los ácidos grasos de cadena larga fueran los responsables de la formación de espuma. No obstante, es necesario realizar más investigación para ver cuál es su efecto en la estabilidad del flóculo. Saber, por ejemplo, qué hace que en un momento dado formen espuma, si bajo el régimen estacionario el pH es constante y francamente básico, pero sólo durante el FB hay espuma.

EPILOGO

La nitrificación eficiente en reactores de mezcla completa depende de la estabilidad de la biomasa floculante. Este tipo de reactores, no obstante, son muy susceptible a la desestabilización, en particular cuando se presenta el fenómeno de esponjamiento. A la fecha, no se sabe bien cuáles son las causas de su origen. Líneas arriba se ha descrito quienes forman a los exopolímeros y como o que son. Se cuenta con algunas evidencias que hacen notar cuales son las variables o factores que influyen en su estabilidad, pero no se tiene preciso por qué y cómo. Saberlo permitiría el mejor manejo de los reactores de mezcla completa, mismos que podrían ser la opción más económica para la oxidación del nitrógeno amoniacal de las aguas residuales. La ventaja y atractivo de estos sistemas nitrificantes es que permiten el tratamiento de efluentes con concentración alta de nitrógeno, por tener una actividad específica nitrificante considerable, ventaja que no tienen los reactores nitrificantes de película fija. Por lo tanto, como complemento a la presente revisión se incluye los resultados experimentales de evaluar los cambios de los exopolímeros, en régimen estacionario, como una contribución a la mejor comprensión de la dinámica de los flóculos nitrificantes.

4.- BIBLIOGRAFIA

- Akunna J.C., Bizeau C. and Moletta R. (1994). Nitrate reduction by anaerobic sludge using glucose at various nitrate concentrations: ammonification, denitrification and methanogenic activities. *Environ. Technol.* **15**, 41-49.
- Anthonisen A. C., Loehr R. C., Prakasam T. B. S. and Srinath E. G. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal WPCF.* **48**, 835-852.
- Atkinson B., Black G. M., Lewis P. J. S. and Pinches A. (1979). Biological particles of given size, shape and density for use in biological reactors. *Biotechnol. Bioeng.* **21**, 193-199.
- Azimi A. A. And Horan N. J. (1991). The influence of reactor mixing characteristics on the rate of nitrification in the activated sludge process. *Wat. Res.* **25** , 419-423.
- Bishop P. L. and Kinner N. E. (1986). Aerobic fixed-film process. *In: Biotechnology Microbial degradation*, Vol. **8**: pp.116-176. Schönborn W.ed. *VCH Publisher, N. Y.* U.S.A.
- Bock E. (1976). Growth of *Nitrobacter* in the presence of organic mater. II Chemoorganotrophic growth of *Nitrobacter agilis*. *Arch. Microbiol.* **108**, 305-312.
- Bock E., Sundermeyer -Klinger H. and Stackebrandt E. (1983) New facultative lithoautotrophic nitrite-oxidizing bacteria. *Arch. Microbiol.* **136**, 281-284.
- Bock E., Koops H. P. And Harms H. (1986). *In* "Nitrification" (Prosser J. I. ed.). Special publications of the Society for General Microbiology Vol **20** pp 17-38. IRL. Press Oxford Washington DC. U.S.A.
- Bock E., Koops H. P., Harms H. and Ahlers B. (1991). The biochemistry of nitrifying microorganism. *In: Variations in: Autotrophic Life*, Vol. **15** pp 171- 200, ed. *Academic Press London*.
- Campbell A. (1957). Synchronization of cell division. *Bacteriol. Rev.*, **21**, 263-273.

- Chudoba J., Ottova V. and Madera V. (1973). Control of activated sludge filamentous bulking-I. Effect of the hydraulic regime or degree of mixing in an aeration tank. *Wat. Res.* **7**, 1163-1182.
- Chudoba J., Cech J. S., Farkac J. and Grau P. (1985). Control of activated sludge filamentous bulking. Experimental verification of a kinetic Theory. *Wat. Res.*, **19**, 191-196.
- Corpe. W. A. (1964). Prodigiosin-Producing bacteria from marine sources. *Appl. Microbiol.* **12**, 13-17.
- Diagger, G.T., Robbins, M.H. and Marshall, B.R. (1985). The design of a selector to control low-F/M filamentous bulking. *J. Water. Pollut. Control Fed.*, **57**, 220-226.
- Dispirito A. A., Taable L. R. and Hooper A. B. (1985). Localization and concentration of hydroxylamine oxidoreductase and citochrome C-552, C-554 and C_m-552 and a in *Nitrosomonas europaea*. *Biochem. Biophys Acta*, **806**, 320-330.
- Echeverria E., Seco A., and Ferrer J.,(1992). Study of factors affecting activated sludge settling in domestic wastewater treatment plants. *Wat. Sci. Tech.* **25**. 273-279.
- Eighmy T., Maratea D. And Bishop P. (1983). Electron microscopic examination of Waste Water biofilm formation and structural components. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1921-1931.
- Eikelboom, D. H. (1975). Filamentous organisms observed in activated sludge. *Wat. Res.* **9**, 365-388.
- Eikelboom D. H. and van Buijsen H.J. (1981). Microscopic Sludge Investigation Manual. IMG-TNO Report A 94a delft.
- Eriksson, L. and Alm, B. (1991). Study of flocculation mechanisms by observing effects of a complexing agent on activated sludge properties. *Wat. Sci. Tech.* **24**, 21-28.
- Farquhar. G.J., and Boyle. W. C. (1971). Identification of filamentous micoorganisms in activated sludge *J. Water Pollut. Control Fed.* **43** 604- 611.

- Farquhar, G.J., and Boyle, W. C. (1972). Control of *Thiothrix* in activated sludge. *J. Water Pollut. Control Fed.* **44**, 14-19.
- Foot, R. J., Robinson, M. S. and Forster C. F. (1994). Systematic activated sludge bulking and foam control., *Wat. Sci. Tech.* **29**, 213-220.
- Forster C. F. (1971). Activated sludge surfaces in relation to the sludge volume index. *Wat. Res.* **5**, 861-870.
- Forster, C. F. (1985). Factors involved in the settlement of activated sludge-I. *Wat. Res.* **19**, 1259-1264.
- Forster, C. F. and Lewin, D. C. (1972). Polymer interactions at activated sludge surfaces. *Effl. Wat. Treat. J.* **12**, 520-525.
- Forster, C.F. and Dallas-Newton, J. (1980). Activated sludge settlement some suppositions and suggestions. *Wat. pollut. Control.* **79**, 338-351.
- Gomez H.J. (1994). Obtención de microflora nitrificante: Nitrificación en diferentes medios de cultivo. Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Goodwin, J. A. S. and Forster, C. F. (1985). A further examination into the composition of activated sludge surfaces in relation to their settlement characteristics. *Wat. Res.* **19**, 527-533.
- Hanaki K., Wantawin Ch. and Ohgaki S. (1990). Nitrification at low levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor. *Wat. Res.* **24**, 297-302.
- Horan, N. J. and Eccles, C. R. (1986). Purification and characterization of extracellular polysaccharides from activated sludges. *Wat. Res.* **20**, 1427-1432.
- Jenkins D., Richard M. G. and Neethling J. B. (1984). Causes and control of activated sludge bulking. *Wat. Pollut. Control Fed.* **56** 455-472.

- Jenkins D., Richard M. G. and Daigger G.T. (1986). Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming. *Wat. Res, Commission Pretoria Republic of South Africa*.
- Jenkins D. (1992). Towards a comprehensive model of activated sludge bulking and foaming. *Wat. Sci. Tech.* **26**, 215-230.
- Jorand F., Zartarian F, Thomas F., Block J.C., Bottero J.Y., Villemin G. Urbain V. and Manem J. (1995). Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs. *Wat. Res.* **29**, 1639-1647.
- Kelly D. P. (1971). Autotrophy : Concepts of lithotrophic bacteria and their organic metabolism. *Ann. Rev. Microbiol.* **25**, 177-210.
- Khan, A. R. and Forster, C. F. (1990). An investigation into the stability of foams related to the activated sludge process. *Enzyme. Microb. Technol.* **12**, 788-793.
- Magara, Y., Nambu, S., and Uotosawa, K. (1976). Biochemical and physical properties of an activated sludge on settling characteristics. *Water Res.* **10**, 71-77.
- Martinez F. Favela T. E. And Gomez J. (1996). Chemical oscillatory pattern of the exopolymers of the nitrifying in steady state culture. (en prensa)
- Mendez-Pampin R., Lema J. M. and Gomez J. (1996). Effect of volatile organic matter on a stabilized nitrifying sludge. (en prensa)
- Michael, G., Shimizu, G. P., Jenkins, D. (1985). The growth physiology of the filamentous organism type 021 N and its significance in activated sludge bulking. *J. Water Pollut. Control Fed.* **57**, 1152-1162.
- Novák, L., Larrea, L., Wanner, J. and Garcia-Heras, J. L. (1993). Non-filamentous activated sludge bulking in a laboratory scale system. *Wat. Res.* **27**, 1339-1346.
- Pipes W. (1978). Microbiology of activated sludge bulking. *Adv. Appl. Microbiol.* **24**, 85-127.

- Poon C. P. C., Wang L. K. and Wang M. H. S. (1986). Activated sludge processes. In: *Handbook of Environmental Engineering*. Wang L.K. and Pereira N. C. (Eds)., Vol 3, pp 229-297. *The Humana Press, Clifton, New Jersey, U. S. A.*,
- Prosser, J. I. (1989). Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **30**, 125-181.
- Rudling L., and Solyom P. (1974). The investigation of biodegradability of branched nonyl phenol ethoxylantes. *Water Res.* **8**, 115-119.
- Sato, T. and Ose, Y. (1980). Floc-forming substances extracted from activated sludge by sodium hydroxide solution. *Wat. Res.* **14**, 333-338.
- Sezgin M., Jenkins D. And Parker D. S. (1978). A unified Theory of filamentous activated sludge bulking. *J. Water Pollut. Control Fed.* **50**, 362-380.
- Smith A. J. and Hoare D.S. (1968). Acetate assimilation by *Nitobacter agilis* in relation to its "obligate autotrophy". *J. Bacteriol.* **95**, 844-855.
- Stichová O. (1990). Study of the mechanism of biological enhanced phosphorus removal in SBRs. M. Sc. Thesis, *Prague Institute of Chemical Tecnology*, Prague
- Sutherland I. W. (1972). Bacterial exopolysaccharides. *Adv. Microbiol Physiol.* **8**, 143-213.
- Sutherland I. W. (1977). Microbial exopolysaccharide synthesis. *Am Chem. Soc. Symp.* Ser. **45**, 40-56.
- Sutherland I. W. And Ellwood D. C. (1979). Current state future prospects microbial exopolysaccharides-industrial polymers of current and future potential. *Soc. Gen. Microbiol.* **29**, 107-150.
- Sutherland I.W. (1979) Polysaccharides produced by *Cystobacter Archangium Sorengium* and *Stigmatella* species. *J. Gen. Microbiol.* **111**, 211-216.
- Suzuki I., Dular V. and Kwok S.C. (1974). Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts. *J. Bacteriol* **120**, 556-568.

- Suzuki Y. and Kwok S. C. (1981). A partial resolution and reconstitution of the ammonia oxidizing system of *Nitrosomona europea*: role of cytochrome c 554. *Can. J. Biochem.* **59**, 484-488.
- Trulear M. G. and Characklis W. G. (1982). Dynamics of Biofilm process. *J. Water Pollut. Control Fed.* **54** 1288-1301.
- Urbain, V., Block, J. C. and Manem, (1993). Bioflocculation in activated sludge, an analytical approach., *Wat. Res.* **27**, 829-838.
- van Leeuwen J. (1988). Ozonation for non-filamentous bulking control in a activated sludge plant treating fuel synthesis waste water. *Water S.A.* **15**, 127-132.
- Wahlberg, E. J., Keinath, T. M. and Parker, D. S. (1992). Relationship between activated sludge flocculation characteristics and cell-surface polysaccharide concentration. *Wat. Sci. Tech.* **26**, 2527-2530.
- Watson, S. W., Bock, E., Harms, H., Koops, H. P., and Hooper, A. B. (1989). Nitrifying Bacteria. In Stanly, J. T., Brynt, M., Pfennig, N., and Holt, J. G. Ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol 3*, pp 1807-1834. Williams and Wolkins, Baltimore. U.S.A.
- Wood D. K. and Tchobanoglous G. T. (1974). Trace elements in biological waste treatment with specific reference to the activated sludge process. Presented at the *29th Industrial Waste Conference, Purdue University, IN.* 761-768.
- Wood P. M., (1986). In "Nitrification". (Prosser J. Y. ed.). Special Publications of the Society for General Microbiology. Vol. **20**, pp. 39-62. IRL. Press Oxford Washington DC. U.S.A.

ANEXO 1

ARTICULO CIENTIFICO

A continuación se presentan los resultados de la investigación de un cultivo nitrificante en régimen estacionario, en donde se analiza el comportamiento de los exopolímeros del floculo (lodo activado). Además de los resultados, se describen con detalle los métodos analíticos utilizados en el estudio. De esta sección puede destacarse a la diálisis como una de las herramientas analíticas que permitieron estudiar la estructura química del floculo con detalle. De los resultados, cabe destacar que por primer vez se hace mención, con evidencias experimentales, de que aún en régimen estacionario, las proteínas exopoliméricas oscilan de modo visible, aunque los exopolisacáridos se mantienen casi constantes. Algunas de las conclusiones descritas en el texto, sugieren que la estabilidad de los floculos dependen principalmente de los exopolisacáridos, pero las proteínas exopoliméricas podría ser el factor que desencadene, bien procesos de esponjamiento, o inestabilidad estructural del floculo.

CHEMICAL OSCILLATORY PATTERN OF THE EXOPOLYMERS OF THE NITRIFYING FLOCS IN STEADY STATE CULTURE

Martinez, F. Favela T. E. and Gomez J.*

Departamento de Biotecnología, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana-
Iztapalalapa
Av. Michoacan y Purisima, Vicentina, C. P. 09340, Iztapalapa, Mexico D. F., MEXICO.

Abstract

The exopolymer concentration of a nitrifying sludge in steady state condition was studied. Protein and carbohydrate content of the exopolymer were analyzed after dissociating the flocs with EDTA (0.1 M) or EDTA-HCL (0.1 M-0.1 M). Nitrate and ammonium concentrations as well as the total proteins and carbohydrates were constant in the steady state condition. The exopolymer protein fraction of the nitrifying floc showed changes in its concentration. Since the carbohydrate content of the floc remained constant while the protein concentration changed following an oscillating pattern, it is suggested that the stability of the flocs depends of the protein fraction. Therefore, bulking of the process can be due to the changes in the protein content of the exopolymer of the nitrifying flocs. After dialysis of the dissociated floc, the exopolymer carbohydrates fraction contained a low concentration of (less than 20%) high molecular weight carbohydrates. Therefore, it is suggested that the low molecular weight carbohydrates (less than 10 KD) are the major constituent of the exopolymer of the nitrifying flocs.

Keywords

Nitrification, exopolymers, protein, carbohydrates, floc

Introduction

Nitrification is a biological process of oxidation of ammonium to nitrate, carried out by two groups of lithoautotrophic bacteria, namely, the ammonia-oxidizers and nitrite-oxidizers, which oxidise the ammonium to nitrite and nitrite to nitrate, respectively (Prosser, 1989; Watson *et al*, 1989; Bock *et al*, 1991). The nitrifying microorganisms are slime formers with a typical zoogeal growth. In activated sludge, the nitrifying bacteria in association with heterotrophic microorganisms form stable floc structures

consisting of cells and exopolymer compounds (Hanaki *et al*, 1990). The flocs formed in the activated sludge can be of two types: (a) flocs constituted by mainly filamentous bacteria with a relatively low content of exopolymer, and (b) flocs made up of non-filamentous nitrifying bacteria and other heterotrophic bacteria (Michael *et al*, 1985). The presence of exopolymer and anions confers a negative charge to the flocs (Magara *et al*, 1976). Settling and sludge volumetric index (SVI) of the nitrifying sludge seems to be associated with the chemical composition of the flocs exopolymer (Novak *et al*, 1993).

One of the major constraints in the study of the chemical composition of the exopolymer fraction is the method of extraction. Goodwin and Forster (1985), Horan and Eccles (1986) and Urbain *et al*. (1993) reported the use of heat, ultrasonication and alkali treatment methods respectively to separate the exopolymer fraction from the cells. on other hand, Eriksson and Alm (1991) used EDTA to chelate Ca^{+2} , Mg^{+2} or Fe^{+3} ions bound in the exopolymers and to dissociate the flocs in order to separate the exopolymers. Horan and Eccles (1986) found that the exopolysaccharide is mainly constituted of glucose, galactose, mannose, galacturonic and glucuronic acid. However, they did not study the type of linkage and arrangement of the sugars.

Carbohydrates, proteins, lipids and nucleic acids are frequently the major components of the floc exopolymer fraction. The relationship between the exopolymer and the SVI is still unknown, but it has been observed that the SVI changes with the floc's chemical composition (Sato and Ose 1980; Goodwin and Forster 1985; Horan and Eccless 1986; Urbain *et al*, 1993). Changes in the SVI provoke variations in the settling of nitrifying flocs, the activated sludge fleets and the nitrifying efficiency of the reactor is lost. This phenomena is known as bulking (Eikelboom 1975; Novak *et al*, 1993). Wahlberg (1992) indicated that carbohydrates and proteins are responsible for the floc's stability and its three dimensional structure. Similarly, Forster (1985) also observed that the concentration of carbohydrate fraction of the exopolymer changed the SVI and the settling rate of the floc.

Proteins have an important role in floc structure, but their concentration is lower than the carbohydrates (Novak *et al.* 1993). The enzymatic activity of the protein in the exopolymer fraction is not known (Khan and Forster, 1990). The proteins can be related to the settling rate and SVI. The divalent ions have an affinity for the exopolymers and they may interact with the polar groups of the exopolymer. Therefore, the carbohydrates and proteins could be linked through the divalent ions to form the flocs (Forster and Lewin, 1972, Forster and Dallas-Newton, 1980).

Bulking of the reactor is frequently associated with foam formation, probably due to the presence of proteins and lipids in the floc (Van Leeuwen, 1988; Jenkins, 1992; Foot *et al.*, 1994). Bulking and foaming normally appears in a steady state nitrifying reactor. The stability of the activated sludge seems to depend of the floc's chemical composition. Therefore, it is important to know if the exopolymer content of the floc remains constant under steady state culture condition. Thus, the protein and carbohydrate content of the floc were evaluated in a nitrifying reactor with a hydraulic retention time (HRT) of 3 days.

Materials and Methods

Reactor and culture conditions

A modified Husmann type reactor (working volume of reactor 2 l) was employed. The volume of the settler was 1 l (Figure 1). The nitrifying reactor was operated with recycling (11 l/d), mixing (300 rpm) and with an aeration rate of 20 l/min. (60% of saturation level). The pH was controlled to 7.6 using a mixture of sodium bicarbonate and $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (40 and 0.4, g/L, respectively). This mixture was called the secondary medium (MS). 10 N NaOH was added through the settler to adjust the pH. Temperature was controlled at 28°C with an external water circulator.

The basal culture medium (BM) contained (g/l): $(\text{NH}_2)\text{SO}_4$, 1.17; KH_2PO_4 , 1.4; MgSO_4 , 0.5; NaCl , 1; NH_4Cl , 0.96; FeSO_4 , 0.15. The continuous flow rates of the MS and BM were adjusted to have a C/N ratio of 1.5, with a HRT of 3 days. The input concentration of N-NH_4^+ was 0.5 g/l.

Analysis

The flocs in a 1 ml of sample were digested by the addition 0.1 ml of 10 N NaOH and heating at 90°C for 30 min. The protein content of the floc was measured by the method of Lowry *et al.*, (1951) using bovine serum albumin as standard. A one sample of 1 ml was used for carbohydrate concentration determined according to Dubois *et al* (1956). Ammonium concentration in a diluted sample (17 ml of sample was diluted to 50 ml with distilled water in the presence of 0.5 ml of 10 N NaOH) was measured using an ammonia specific electrode (Phoenix®) and NH_4Cl as standard (APHA, 1985). Nitrites and nitrates were measured using a Capillary Electrophoresis apparatus (Millipore® model 4000) under the following conditions: a microcapillar silica fused column (60 cm of length and 70 μm of internal diameter), with 30 mA of current and 20 KV, and a electrolyte of 10 mM Na_2SO_4 . The sample application and running times were 4 sec and 4 min., respectively. The absorbance was measured at 212 nm. A mixture of nitrite and nitrate (100 mg/l each) was used as standard.

Floc dissociation and analysis

A homogeneous sample (5 ml) from the reactor was mixed with 5 ml of 0.1 M ethylen diamine tetracetic acid (EDTA), vortexed for 10 min., centrifuged at (3020 g for 10 min.). The carbohydrates of the exopolymer was measured from the supernatant, and then the supernatant was dialyzed (10 KD cut off) for three days against distilled water. Exopolymer proteins and carbohydrates in the dialysate were measured as described above. Dissociation of flocs was also made using a mixture of EDTA 0.1M and HCl 1M (4.6 and 0.4 ml, respectively) added to 5 ml of sample.

Results and Discussion

The concentration of exopolymer present in nitrifying flocs under steady state culture condition has been little studied. In balanced growth, the extensive properties of culture such as synthesis of protein and carbohydrates and the rate synthesis remained constant under steady state conditions Campbell (1957). The synthesis of exopolymer of the floc may be considered as extensive properties. The stability of the floc depends mainly of the exopolymer composition. It has been reported that bulking phenomena appear to be due to changes in the composition of the exopolymer such as carbohydrates, proteins, lipids and nucleic acids of the floc (Margara *et al.*, 1976; Urbain *et al.*, 1993). Occurrences of bulking are associated with foam formation in steady state activated sludge resulting in the instability of the nitrifying reactors (Eikelboom, 1975; Foot *et al.*, 1994).

The performance of the nitrifying reactor during the steady state condition is shown in Fig. 2. It can be seen that at steady state condition, the input volumetric rate (Q_{in}) for KD and output volumetric rate (Q_{out}) for NO_3-N were constant. The microbial biomass (Q_{out} of Prot-N) concentration was maintained constant at 0.028 g/l by means of manual purges. A very low (almost zero) Q_{out} for the NH_4^+-N indicated the high efficiency of nitrification (around 95%) in the reactor.

Since the analysis of the exopolymer fraction requires floc dissociation, several procedures have been carried out. Sato and Ose (1980) and Goodwin and Foster (1985) studied the effect of different concentrations of NaOH and temperature respectively, on floc dissociation. Eriksson and Alm (1991) studied the effect of EDTA on the properties of the flocs. Urbain *et al.*, (1993) used sonication to improve the efficiency of the floc dissociation. In these studies, the sludges used were not the same and results obtained were also different.

The chelating features of EDTA on the microbial biomass has been reported. Nevertheless, HCl and other strong acids and the sonication (Jorand *et al.*, 1995) allow floc disruption and also provoke the disruption of cells resulting in the release of intracellular proteins which might interfere with the quantification of proteins of the exopolymers. On the other hand, problems of interference by the EDTA in protein measurement are also mentioned. However, by dialyzing the sample this problem was solved. Results of the effect of different concentrations of EDTA and HCl on the extraction of exopolymer proteins from the flocs are presented in the Table 1. At EDTA concentrations from 0.01 to 0.1 M, extracted protein concentration remained constant (20-21 mg/l), but, at HCl concentrations from 0.025 to 1.0 M, the amount of protein extracted increased from 30 to 72 mg/l. This could be due to cellular disruption of the nitrifying biomass when HCl was used. With the purpose of improving the flocs dissociation efficiency without the cell damage, a mixture of EDTA (0.1 M) and HCl (0.01 M) was used. Dialyzed time was also evaluated and after three days no interference by the EDTA was observed. Figure 3 shows the profiles of the exopolymer content of the reactor over a 15 days period. After floc dissociation with EDTA (0.1 M) and a mixture of EDTA (0.1 M) -HCl (0.01N), the concentration of proteins were almost the same indicating that HCl at this low concentration tested (0.01N) did not have any additive effect on protein extraction. Therefore EDTA 0.1 M was used for further extraction. In Figure 3, it is also shown that in spite of the reactor operating under steady state conditions at a HRT of 3 d (Fig. 2), the extracellular protein content was oscillating between 40 and 5 mg/l. The maximum protein concentration was reached in a 10 days interval, nevertheless that the nitrifying culture was maintained at steady state condition. These changes in the exopolymer protein concentration might be responsible of the change in the SVI, affecting the settling characteristics of the activated sludge and thus to decrease its stability. In fact, Horan and Eccles (1986) and Urbain *et al.* (1993) demonstrated that the composition of the exopolymers is related to the floc stability, particularly with the SVI, but no evidence was shown. Goodwin and Forster (1985)

observed that the exopolysaccharide concentration is strongly related to the settling rate, being the carbohydrates the main fraction of the exopolymer. Results of the current work suggested that the settling of the nitrifying sludge depends of the protein fraction of the exopolymer. To correlate the SVI with the protein change in the floc in our laboratory further work is being done.

Profiles of the total carbohydrates and exopolymer carbohydrates in the steady state nitrifying reactor over a 15 days period are shown in Figure 4. Both fractions, total and exopolymer carbohydrates, remained constant (110 and 30 g/l, respectively). More than 70% of the total carbohydrates constitute the biomass. In order to determine the molecular size of the carbohydrates constituting the exopolymer, the samples were dialyzed over three days. This resulted in a 40% reduction of carbohydrate content in the dialysate, suggesting that the exopolymer fraction contained mainly low molecular weight carbohydrates (less than 10 KD). The role of any hydrolytic enzyme present in the extract contributing to the hydrolysis of the high molecular weight carbohydrates was rejected, since a sample after the dissociation floc and dialysis of the exopolymer fraction for 6 days, at room temperature (control), and another sample processed by the same method but heated at 121°C 15 min. prior to dialysis showed similar profiles (Fig. 5). Therefore, the decrease in carbohydrate concentration after dialysis was mainly due to the presence of carbohydrates with molecular weight less than 10 KD. High molecular weight carbohydrates (>10 KD) were only 20% of the exopolymer. These results are in contrast to the reported by Goodwin and Forster (1985) and Horan and Eccles (1986), who had indicated that the carbohydrates of the exopolymer were of high molecular weight. This discrepancy might be explained in terms of differences in the nitrifying sludge used.

In order to corroborate if the protein variations in the exopolymer continue over longer periods, the reactor was operated under steady state conditions over a 30 days. Results are shown in Fig. 6. Exopolymer protein showed the same profile and reached maximum

and minimum values of 50 and 5 g/l, respectively, with oscillations frequency of 10 days. The statistical analysis of the exopolymer carbohydrate concentrations did not show any significant changes ($P > 0.0001$, $\alpha = 0.05$) suggesting that the stability of the nitrifying flocs may be dependent on the proteins rather than carbohydrates.

To test the presence of proteolytic enzymes, a dialyzate was carried out for 6 days. It can be seen that the concentration of exopolymer protein remained constant (46 ± 1.6), therefore the oscillation of the protein in the floc are due to other factors. Regarding that Goodwin and Forster (1985) and Jeskins (1992) found that changes in the composition of the exopolymer produced variations in the settling of floc and the bulking in the reactor can appear. Other workers have indicated the bulking occurrences might be due to: (i) changes in the aeration level, (ii) the F/M ratio (Diagger *et al.*, 1985), (iii) the accelerated growth of filamentous microorganisms as *Sphaerotilus natans*, *Nocardia*, or (iv) for any other factors. Magara *et al* (1976) related the exopolymer carbohydrates and SVI with the enhanced growth of the filamentous microorganisms, however, the real causes for the bulking occurrences of the reactor is not know (Eikelboom, 1975). Regarding the bulking of the reactor with non filamentous organisms, frequently of is related to the chemical composition of the wastewater that affects the stability of the floc (Novák *et al*, 1993).

In many activated sludges, only 20% of the total material is non-volatile. The chemical analysis of the activated sludge studied here showed that around 80% of total weight was the inorganic fraction. Nevertheless, the organic matter (particularly the protein) could be responsible for the sludge stabilization, since the concentration in the steady state of the nitrifying culture is not constant inside the floc. To stabilize the settling of the activated sludge, it is important to know operational condition with minimum oscillation of protein concentration. Knowledge from this study will allow the design of methods to control the bulking occurrences.

It has been suggested that the exopolymer carbohydrates of the flocs are of high molecular weight (Sato and Ose, 1980; Novak *et al*, 1993), but we found that only a small fraction of the carbohydrate (20%) of the exopolymer had a molecular weight greater than 10 KD. To confirm that the protein fraction of the exopolymer is mainly responsible for the SVI and settling, further investigation is needed.

Conclusion

Two main exopolymers chemical fraction of a nitrifying activate sludge, protein and carbohydrates, was analysed. It was found that the exopolymer protein fraction oscillated in the nitrifying reactor under steady state conditions, and that the molecular weight was greater than 10 KD. On the other hand, the carbohydrates remained constant under the same conditions, where 80% of the fraction had a molecular weight less than 10 KD.

Acknowledgment

Funding for this work was provided by the European Union (grant No. CII-CT93-0040). Martinez CONACYT for supporting this work .

References

- APHA (1985). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater 16^e edition, 1985, American Public Health Association, Washington, D. C:
- Bock, E., Koops, H. P., Harms, H., and Ahlers, B. (1991). The biochemistry of nitrifying microorganism. *In: Variations in: Autotrophic Life*, pp 171- 200, ed. Academic Press London.
- Campbell, A. (1957). Synchronization of cell division. *Bacteriol. Rev.*, **21**, 263-273.
- Diagger, G.T., Robbins, M.H. and Marshall, B.R. (1985). The design of a selector to control low-F/M filamentous bulking. *J. Water Pollut. Control Fed.*, **57**, 220-226.

- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J. K., Robers, P.A. and Smith, F. (1956). Colorimetric determination of sugars and related substances. *Anal. chem.*, **28**, 350-352.
- Eikelboom, D. H. (1975). Filamentous organisms observed in activated sludge. *Wat. Res.* **9**, 365-388.
- Eriksson, L. and Alm, B. (1991) Study of flocculation mechanisms by observing effects of a complexing agent on activated sludge properties. *Wat. Sci. Tech.*, **24**, 21-28.
- Foot, R. J., Robinson, M. S. and Forster C. F. (1994). Systematic activated sludge bulking and foam control., *Wat. Sci. Tech.*, **29**, 213-220.
- Forster, C. F. (1985). Factors involved in the settlement of activated sludge-I. *Wat. Res.*, **19**, 1259-1264.
- Forster, C. F. and Lewin, D. C. (1972). Polymer interactions at activated sludge surfaces. *Effl. Wat. Treat. J.* **12**, 520-525.
- Forster, C.F. and Dallas-Newton, J. (1980). Activated sludge settlement some suppositions and suggestions. *Wat. pollut. Control.* **79**, 338-351.
- Goodwin, J. A. S. and Forster, C. F. (1985). A further examination into the composition of activated sludge surfaces in relation to their settlement characteristics. *Wat. Res.* **19**, 527-533.
- Hanaki K., Wantawin Ch. and Ohgaki S. (1990). Nitrification at low levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor. *Wat. Res.* **24**, 297-302.
- Horan, N. J. and Eccles, C. R. (1986). Purification and characterization of extracellular polysaccharide from activated sludges. *Wat. Res.* **20**, 1427-1432.
- Jenkins, D. (1992). Towards a comprehensive model of activated sludge bulking and foaming. *Wat. Sci. Technol.* **26**, 215-230.
- Jorand, F., Zartarian, F, Thomas, F., Block, J.C., Bottero, J.Y., Villemin, G, Urbain, V and Manem, J. (1995). Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs. *Wat. Res.* **29**, 1639-1647.

- Khan, A. R. and Forster, C. F. (1990). An investigation into the stability of foams related to the activated sludge process. *Enz. Microb. Technol.* **12**, 788-793.
- Lowry, O. H., Rosen Brough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Magara, Y., Nambu, S., and Utosawa, K. (1976) Biochemical and physical properties of an activated sludge on setting characteristics. *Water Res.* **10**, 71-77.
- Michael, G., Shimizu, G. P., Jenkins, D. (1985). The growth physiology of the filamentous organism type 021 N and its significance activated sludge bulking. *J. Water Pollut. Control Fed.* **57**, 1152-1162.
- Novák, L., Larrea, L., Wanner, J. and Garcia-Heras, J. L. (1993). Non-filamentous activated sludge bulking in a laboratory scale system. *Wat. Res.* **27**, 1339-1346.
- Prosser, J. I. (1989) Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **30**, 125-181.
- Sato, T. and Ose, Y. (1980). Floc-forming substances extracted from activated sludge by sodium hydroxide solution. *Wat. Res.* **14**, 333-338.
- Urbain, V., Block, J. C. and Manem, (1993) Bioflocculation in activated sludge, an analytic approach., *Wat. Res.* **27**, 829-838.
- van Leeuwen J. (1988). Ozonation for non-filamentous bulking control in a activated sludge plant treating fuel synthesis waste water. *Water S.A.* **15**, 127-132.
- Wahlberg, E. J., Keinath, T. M. and Parker, D. S. (1992). Relationship between activated sludge flocculation characteristics and cell-surface polysaccharide concentration. *Wat. Sci. Tech.* **26**, 2527-2530.
- Watson, S. W., Bock, E., Harms, H., Koops, H. P., and Hooper, A. B. (1989). Nitrifying Bacteria. In Stanly, J. T., Brynt, M., Pfennig, N., and Holt, J. G. Bergy's Manual of Systematic Bacteriology Vol 3, pp 1807-1834. ed. Williams and Wolkins, Baltimore.

Table 1. Protein measurement after dissociation of the flocs with various concentrations of EDTA or HCl.

EDTA (M)	Protein (mg/l)	HCl (M)	Protein (mg/l)
0.001	2	0.025	30
0.010	20	0.010	55
0.050	21	0.500	69
0.100	20	1.000	72

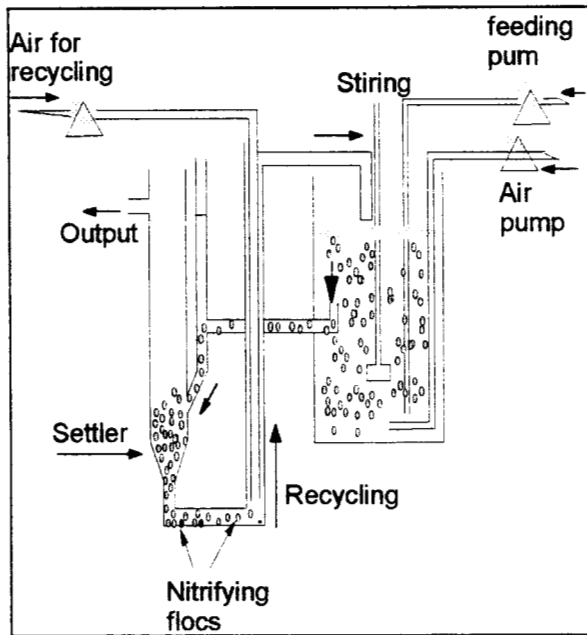


Fig. 1. Nitrifying reactor with biomass recycling. The reactor vessel was 2 l working volume connected to a settler of 1 l.

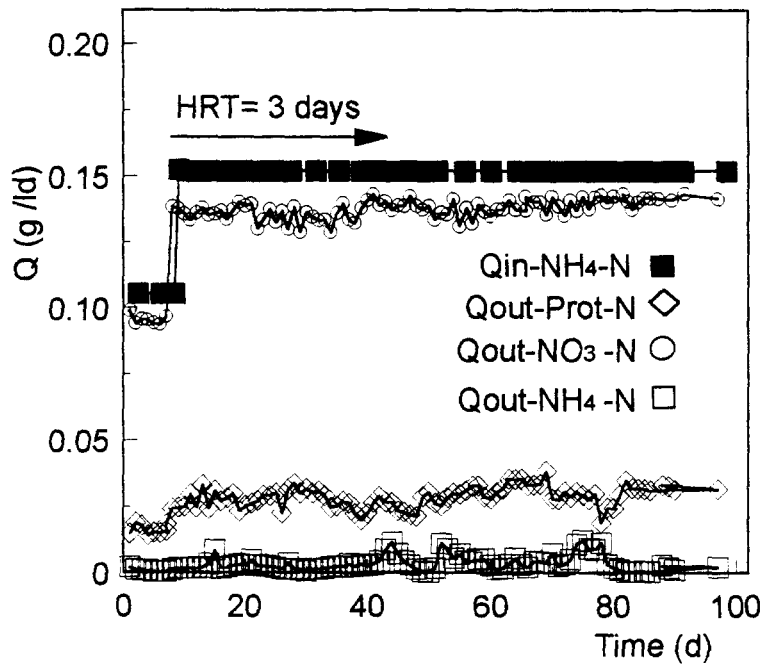


Fig. 2. Volumetric rates of input (Q_{in}) and output (Q_{out}) in the nitrifying reactor in steady state condition. The culture condition were pH 7.6 ± 0.3 and temperature 28°C with a recycling rate of 11 l/d and HRT of 3 d. The NH_4^+ -N concentration in the input was 0.5 g/l.

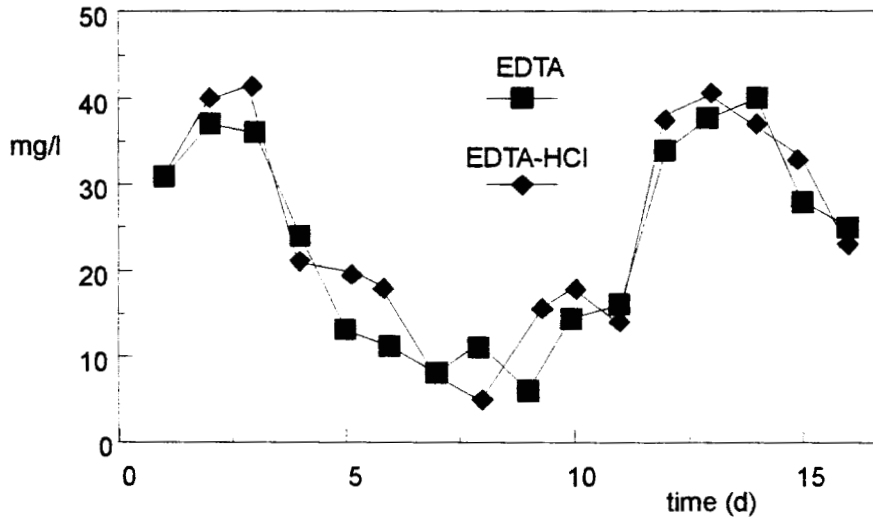


Fig. 3. Exopolymer protein profiles of the nitrifying floc. A mixture of EDTA and HCl (0.1 M and 0.01 N, respectively) or EDTA (0.1 M) was used to dissociate the nitrifying floc.

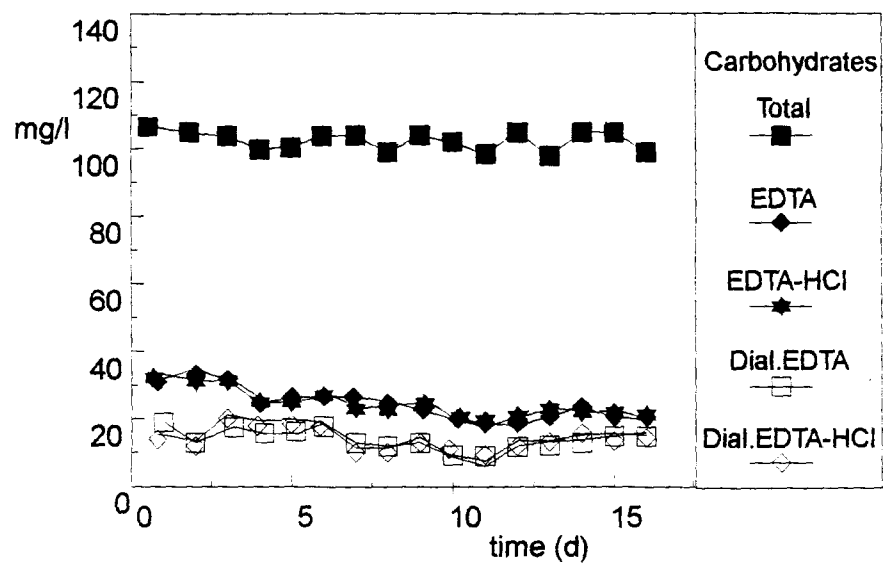


Fig. 4. Total carbohydrates of the activated sludge(upper symbol). Exopolymer carbohydrates after dissociation of the flocs with EDTA 0.1 M or EDTA 0.1 M-HCl 0.01M. Open symbols are the carbohydrates after three days of dialysis as described in methods.

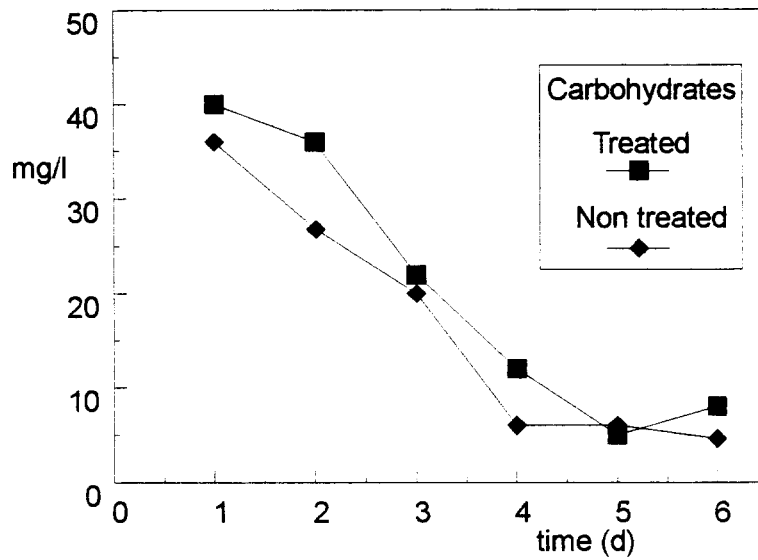


Fig. 5. Carbohydrates of the flocs after dissociation with EDTA (0.1M). A set of samples (square symbols) were heated at 121°C for 15 min before dialysis while no treatment was given to the other set of samples. All samples were dialyzed for 6 days as indicated in the methods.

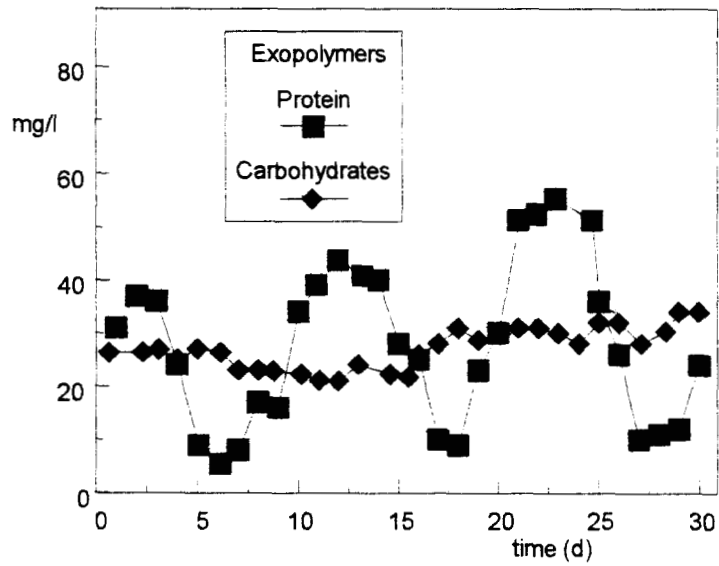


Fig. 6. Carbohydrates and protein content of the exopolymer from a nitrifying sludge. The dissociation of the flocs was made with EDTA (0.1M). Protein measurement was made after the dialysis of the samples as described in methods.