



# Aplicación de la medida de ATP2G en la detección temprana de vertidos a escala real

En el presente estudio se evalúa la capacidad de diagnóstico de la ATPmetría de segunda generación ATP2G de Microplanet sobre la biomasa presente en el fango activo de una estación depuradora de aguas residuales (EDAR) que sufre vertidos incontrolados. Se concluyó que la medida del índice de estrés de la biomasa a partir de la medición de ATP permite diagnosticar la inhibición de la actividad microbiana, incluso antes de detectar anomalías en el afluente de la EDAR, lo que facilita la toma de medidas de control.

## Palabras clave

ATP, fangos activos, vertidos.

## APPLICATION OF ATP2G MEASURE IN SPILLS EARLY DETECTION AT REAL SCALE

*In this study, the health of activated sludge biomass exposed to uncontrolled spills is evaluated using a second-generation ATP-based monitoring tool (ATP2G, Microplanet). It was concluded that biomass stress index measured through ATP2G allows diagnosing the inhibition of microbial activity, even before detecting anomalies in the influent of the waste water treatment plant (WWTP), which facilitates the early application of appropriate operational control measures.*

## Keywords

ATP, activated sludge, spills.

## Nuria Oliver Rajadel

doctora en Ingeniería del Agua y Medioambiental por la Universidad Politécnica de Valencia (UPV), técnica de I+D+i en el Área de Residuales de Global Omnium

## Sandra Enguñadanos Martínez

ingeniera química, jefa de EDAR Camp de Turia de Empresa General Valenciana del Agua, S.A. (Egevasa)

## Ángela Baeza Serrano

máster en Ingeniería Ambiental por la Universidad Politécnica de Valencia, técnica I+D+i en el Área de Residuales de Global Omnium

## Camino Sánchez Javega

máster en Ingeniería del Tratamiento y Reciclaje de Aguas Residuales Industriales por UCV-AIDIMME, técnica de explotaciones en el Área de Residuales de Global Omnium

## Juan Ramón Ortiz

director comercial de Microplanet Laboratorios, S.L.



## 1. INTRODUCCIÓN

Uno de los parámetros fundamentales en el diseño y operación de los sistemas de tratamientos de aguas residuales mediante fangos activos es la concentración de biomasa (Arnáiz *et al.*, 2000). Muchos de los parámetros de control de proceso (tiempo de retención celular, caudales de recirculación y purga, carga orgánica, etc.) están condicionados a la cantidad de microorganismos presentes en el fango.

Es evidente la importancia de conocer la fracción funcional de microorganismos en cualquier tratamiento biológico, ya que la mayoría de los fallos en sistemas dependientes de microorganismos se deben a la imposibilidad del operador de detectar y diagnosticar de forma rápida cualquier cambio en la salud (opción a cita: estado) y composición de la biomasa (Archibald and Young, 2004).

A pesar de ello, no existe un método extendido efectivo de medida de esta biomasa, siendo habitualmente monitorizada mediante la medida de sólidos suspendidos (SS) y su fracción volátil (SSV).

La medida de los SSV mediante métodos gravimétricos presenta la ventaja de ser una medida simple. Sin embargo, incluye además de microorganismos activos, material inerte, polímeros extracelulares, microorganismos muertos y material adsorbido. Asimismo, es una medida que consume bastante tiempo.

Existen diversos métodos indirectos de medida de la biomasa basados en la medida de componentes celulares, como el adenosín trifosfato (ATP). El ATP es la principal fuente de energía para la mayoría de las funciones celulares. Es un componente bioquímico central presente en todos los microorganismos y

específico de los microorganismos vivos, por lo que puede relacionarse con la biomasa viva.

La tecnología de detección del ATP es un método indirecto de detección de la biomasa que se basa en el principio de luminiscencia. Mediante una reacción enzimática y en presencia de la proteína Lucifera y la enzima Luciferasa, el ATP se metaboliza desprendiendo luz. Los resultados medidos en un equipo fotodetector (luminómetro) se expresan en URL (unidades relativas de luz).

Esta cantidad de luz resultante es directamente proporcional a la cantidad de ATP presente en la muestra. La **Ecuación 1** muestra la reacción de metabolización del ATP en presencia de la enzima luciferasa.

En cualquier muestra líquida que contenga microorganismos, el ATP analizado puede presentarse en dos formas particulares de ATP molecular:

- ATP intracelular (cATP): contenido dentro de las células vivas. La vigilancia de este parámetro, permite cuantificar en tiempo real la biomasa activa viva y seguir su crecimiento bajo condiciones óptimas de operación o detectar, de manera temprana, la inhibición de la actividad biológica resultado de un estrés ambiental y operacional. cATP muestra un nivel relativamente estable en un reactor biológico optimizado y con buen rendimiento.

- ATP extracelular (dATP): ubicado fuera de las células y que ha sido li-

berado por organismos estresados o muertos. Se denomina ATP extracelular o ATP disuelto (dATP).

La diferenciación y cuantificación precisa de estos dos tipos de ATP es indispensable para realizar mediciones basadas en bioluminiscencia. Con esta medición diferencial se obtiene una evaluación real de la salud y de la actividad biológica del agua. Teniendo un conocimiento más real del estado de la muestra es posible controlar mejor los procesos biológicos.

La ATPmetría de segunda generación ATP2G de Microplanet se presenta como una opción:

- Rápida: proporciona resultados en minutos en lugar de horas, días o semanas.
- Exacta: los kits de análisis están diseñados específicamente para muestras de agua, aguas industriales de proceso y de aguas residuales.
- Completa: logra la recuperación total de todos los microorganismos presentes en la muestra, no solo de una pequeña fracción.
- Cuantitativa: incluye un patrón de medida para cuantificar y normalizar los resultados.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad de diagnóstico de afección sobre la biomasa presente en el fango activo de una EDAR que sufre vertidos incontrolados mediante la ATPmetría de segunda generación ATP2G de Microplanet.



**Ecuación 1**

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la EDAR Camp de Turia I (**Figura 1**), ubicada en la provincia de Valencia. Esta EDAR da servicio a una población de 57.045 habitantes equivalentes (he), correspondiente a un caudal de 8.843 m<sup>3</sup>/día y cuenta con un tratamiento de fangos convencional, con 4 reactores biológicos en serie aireados mediante turbina de doble velocidad seguidos de decantación secundaria.

Durante los meses de octubre a febrero, coincidiendo con la campaña cítrica de la zona, la EDAR recibe vertidos de diferente índole (pesticidas, fungicidas, ceras, etc.) que pueden llegar a afectar a la biomasa del proceso de fangos activos.

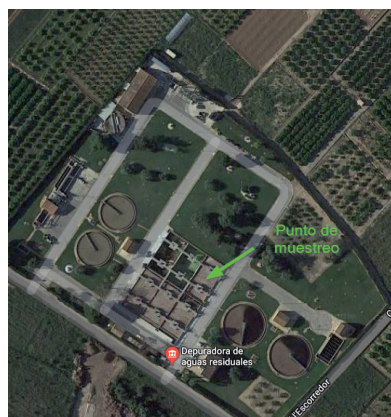
En el presente estudio se monitorizó el estado de la biomasa presente en el fango activo de la EDAR semanalmente, mediante la recogida y medición del ATP en muestras puntuales del reactor 1 durante los 5 meses de duración de la campaña de la naranja y mandarina.

Las mediciones de ATP se llevaron a cabo inmediatamente después de la recogida de las muestras, en el propio laboratorio de la EDAR, y usando la tecnología suministrada por Microplanet.

Para cada muestra se llevaron a cabo dos mediciones de ATP: el ATP total (tATP) y el ATP disuelto o extracelular (dATP). El ATP total es la medida de todo el ATP contenido en una muestra, el cual incluye el ATP de las células vivas y el ATP de la biomasa muerta o 'moribunda'. En cambio, el ATP disuelto, llamado también extracelular, representa el ATP liberado desde las células que están bajo estrés o que han muerto.

A partir de los resultados obtenidos con estas determinaciones se pueden calcular los siguientes pa-

**FIGURA 1.** Vista aérea de la EDAR de Camp de Turia I.



rámetros de control del estado del proceso biológico:

- cATP: ATP intracelular. Es el ATP contenido en los microorganismos vivos y, por lo tanto, una indicación directa de su concentración:

$$cATP = tATP - dATP$$

A partir de este parámetro se puede calcular la concentración de biomasa viva en el reactor (AVSS) en mg/L:

$$AVSS = 0,5 * cATP \text{ (ng/mL)}$$

- BSI: el índice de estrés de la biomasa. Representa el nivel de estrés al

que está sometida la biomasa. Este índice permite estudiar la toxicidad de un biorreactor o de un efluente:

$$BSI (\%) = dATP/tATP$$

- ABR: proporción de microorganismos en los sólidos suspendidos del licor mezcla del reactor biológico. Un incremento de la ABR, mejora la calidad de los lodos y acelera la decantación:

$$ABR (\%) = (cATP * 0,5) / SSLM$$

Los parámetros cATP y ABR pueden ser empleados en el control rutinario del proceso, como sustitución o complemento de las mediciones de SSLM y SSVLM, para el propósito de medición de la biomasa activa.

En la **Tabla 1** se recogen los valores guía de los parámetros mencionados. Un nivel de estrés (BSI) por debajo del 30% es normal en una población bacteriana sana, entre el 30 y el 50% sería conveniente tomar medidas preventivas y un incremento superior al 50% es indicativo de un fenómeno de alteración de la actividad microbiana que probablemente requerirá la toma de medidas correctivas.

**TABLA 1**

**UMBRALES INDICATIVOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.**  
FUENTE: WWW.MICROPLANET-PSL.COM.

Location	Parameter	Good control	Preventive action required	Corrective action required
Influent	BSI	< 50	50 to 75	> 75
Biorreactors	cATP	Process specific		
	BSI	< 30	30 to 50	> 50
	ABR	> 25	10 to 25	< 10
Activated sludge	s-fbATP	< 30	30 to 50	> 50
Attached growth	s-agATP	> 90	75 to 90	< 75
Effluent	cATP	< 50	50 to 250	> 250



FIGURA 2. Biomasa viva medida como cATP.

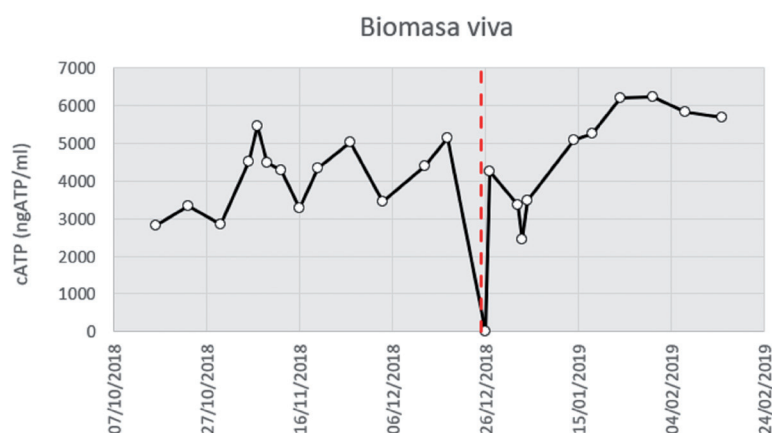
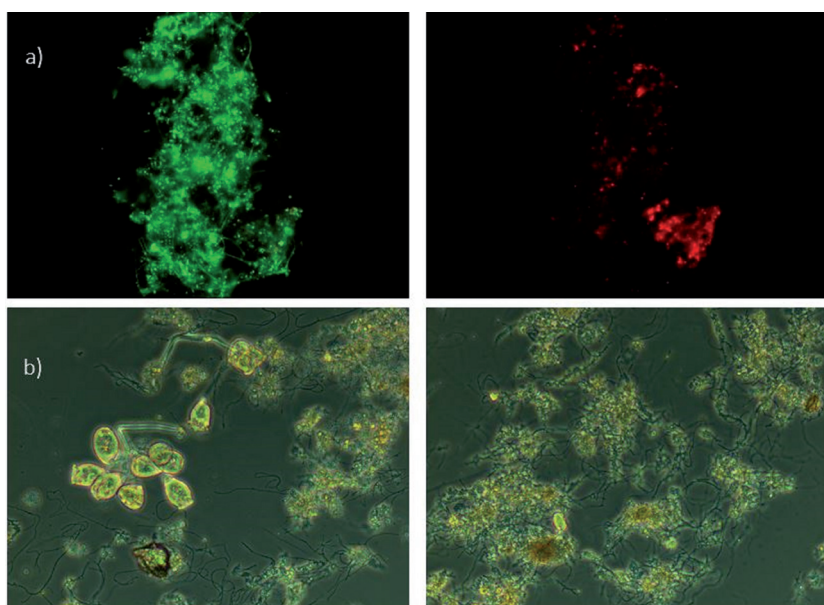


FIGURA 3. A) Resultados de viabilidad celular. Izquierda: células viables; derecha: células no viables. B) Fotografía de una muestra de fango activo en vivo donde se observa una proporción media-alta de bacterias filamentosas entre las que predomina *Ca. Microthrix parvicella*.



Durante el estudio se midieron DQO total, NT,  $N-NH_4^+$  y PT en afluente y efluente y SS, SSV, Índice Volumétrico de Fangos (IVF) y DQO soluble en el fango activo según Standard Methods (APHA, 2005).

Además, se monitorizó la edad del fango, temperatura, oxígeno

disuelto, carga másica y aspecto microscópico del fango en el reactor 1. Por último, se realizaron medidas puntuales de la viabilidad celular mediante análisis de imágenes de tinción epifluorescente SYTO9/IP con el software ImageCAI (Golfe et al., 2014).

TABLA 2

RESULTADOS DE VIABILIDAD CELULAR

Fecha	Células viables (%)
23/10/2018	68±2
27/12/2018	58±2

3. RESULTADOS

En este apartado se muestran los resultados obtenidos de las mediciones de ATP llevadas a cabo en el reactor biológico de la EDAR objeto de estudio, así como los valores de los parámetros de control del proceso evaluados.

Los valores de ATP celular (cATP) oscilaron entre 0 y 6.230 ng/ml, con un valor promedio de 4.221 ng/ml.

En la **Figura 2** se observa un valor de 0 ngATP intracelular /mL. Este valor no significa que toda la biomasa esté muerta y que, por tanto, es incapaz de realizar sus funciones de depuración, sino que los microorganismos están gravemente afectados, ya que sus membranas celulares están debilitadas y se produce liberación de ATP o incluso lisis, cuando se exponen al tampón suave usado en el análisis. Estos casos en los que  $dATP = tATP$  y, por tanto,  $cATP = 0$ , deben tomarse como una alerta para actuar inmediatamente y corregir el estrés (déficit de oxígeno, de nutrientes o una toxicidad severa). Un estrés sostenido en este nivel puede resultar en un fallo completo del reactor biológico.

De hecho, las determinaciones de viabilidad celular del fango activo mediante microscopía de epifluorescencia (**Tabla 2** y **Figura 3**), muestran una disminución del 15% del

» Los parámetros cATP y ABR pueden ser empleados en el control rutinario del proceso, como sustitución o complemento de las mediciones de SSLM y SSVLM, para el propósito de medición de la biomasa activa



porcentaje de células viables, resultado, probablemente, de la presencia de un tóxico en la EDAR.

Con respecto al índice de estrés de la biomasa (BSI), los valores obtenidos de las mediciones realizadas en la EDAR Camp de Turia entre los meses de octubre y diciembre del 2018, indicaron, en general, un buen estado de la misma, situándose el índice siempre por debajo del 30% (Tabla 1). No obstante, este valor se incrementó de manera abrupta a un 100%, el 26-12-2018, coincidiendo con un ABR = 0 y un cATP = 0 (Figura 4).

El valor de cATP = 0 ng/ml y, por lo tanto, 100% de BSI se midió la mañana siguiente a la entrada de un vertido incontrolado con DQO >1.500 mg/L en la EDAR entre el 24-12-2018 y el 25-12-2018 (Figura 4), lo que apuntaba a una biomasa gravemente alterada.

Esta concentración máxima de materia orgánica medida en el influente de la EDAR, coincide con un incremento progresivo, desde el 24-12-2018 a las 14:00 horas aproximadamente, de la concentración de amonio medida en el reactor biológico, llegándose a alcanzar una concentración máxima de 46 mg N/L dos días después, el 26 de diciembre a las 19:13 horas (datos no mostrados). Estas altas concentraciones en el reactor pueden indicar un problema de inhibición de la biomasa nitrificante como resultado de la entrada, el día 24-12-2018, de un vertido incontrolado a la EDAR.

Con respecto a la concentración de biomasa viva presente en el reactor, calculada a partir de los valores medidos de ATP intracelular, esta osciló entre 0 mg/L (después del vertido) y 3.115 mg/L, con un valor promedio de 2.110 mg/L (Figura 5).

FIGURA 4. Valores de DQO medidos en el influente y efluente de la EDAR Camp de Turia e índice de estrés de la biomasa (BSI).

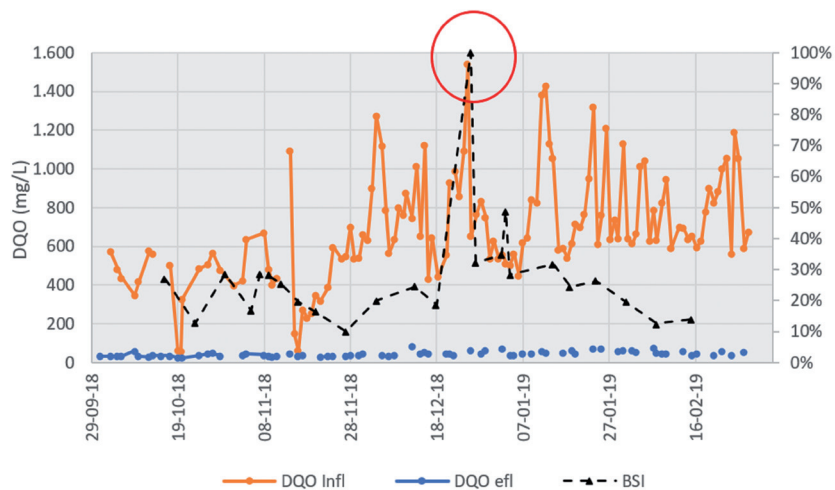


FIGURA 5. Sólidos suspendidos volátiles activos.

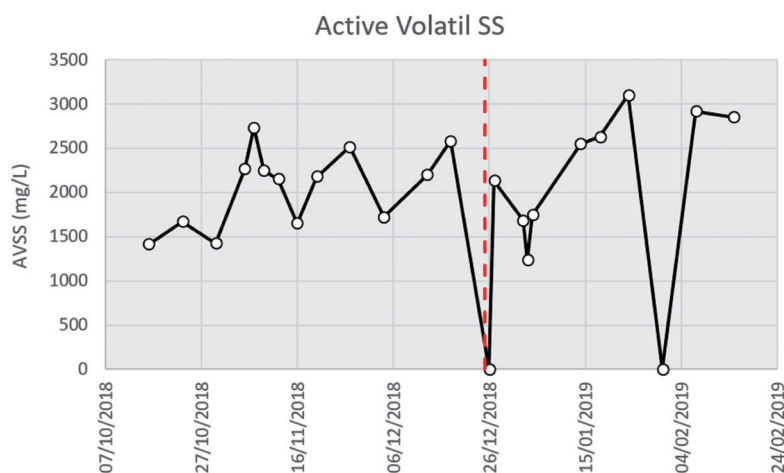
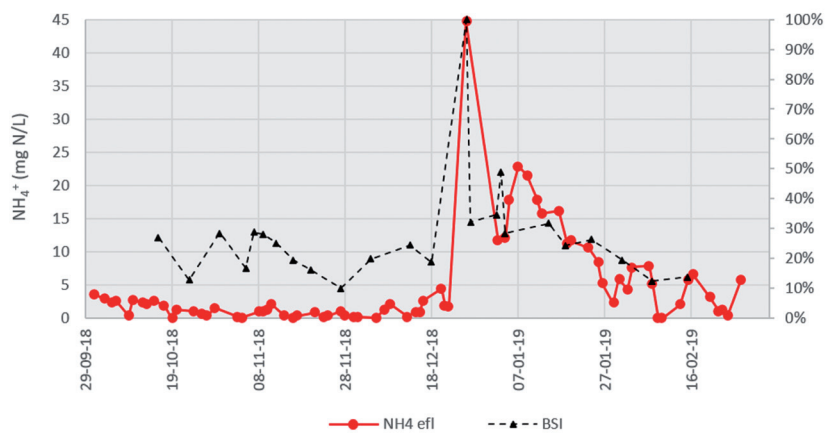
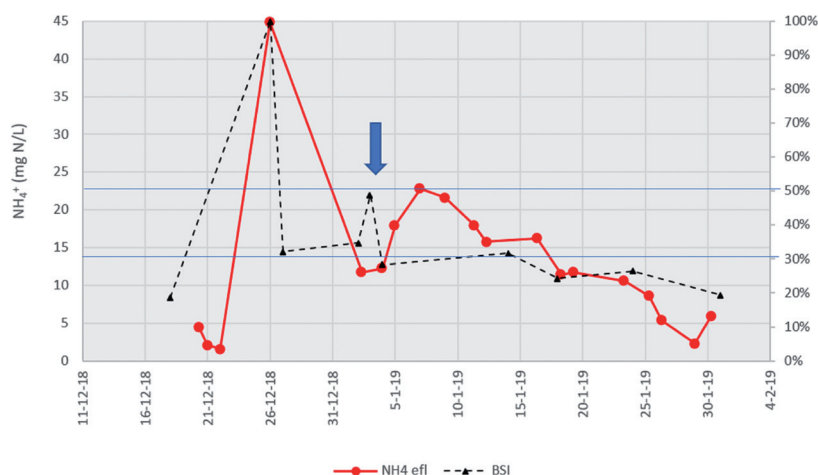


FIGURA 6. Evolución del índice de estrés de la biomasa y concentración de amonio en el efluente.

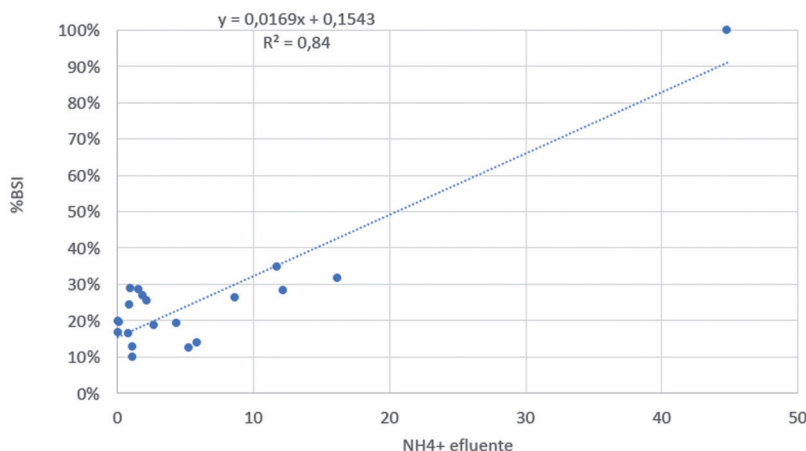




**FIGURA 7.** Detalle de la evolución del índice de estrés de la biomasa y concentración de amonio en el efluente.



**FIGURA 8.** Correlación entre el índice de estrés de la biomasa presente el licor mezcla y la concentración de amonio en el efluente de la EDAR.



Estos valores de Sólidos Suspendedos Activos (AVSS) mostraron una correlación débil con los SSVLM ( $R^2 < 0,5$ ), lo cual indica que la medida de SSVLM no es un indicador directo de la biomasa viva del licor mezcla, ya que también engloba la biomasa muerta y otro tipo de materia orgánica inerte.

La evolución del índice de estrés de la biomasa durante el estudio se muestra en la **Figura 6**. A mediados de enero ya se consiguió recuperar el proceso biológico al estado previo al vertido, obteniéndose valores de BSI de nuevo por debajo del umbral del 30%, indicando un buen control del proceso de depuración.

Se observó una segunda subida del índice de estrés a principios de año (flecha azul de la **Figura 7**). En este caso se observa cómo el índice de estrés  $>50\%$  anticipa la afección de la biomasa, que se ve reflejada en una subida del amonio 2 días después.

El índice de estrés mostró una fuerte correlación, directa y significativa con la concentración de amonio en el efluente de la EDAR (**Figura 8**), de modo que bajas concentraciones de amonio a la salida de la EDAR coinciden con bajos valores de BSI.

Además, este índice también mostró una correlación directa con la DQO y con el NT medidos en el efluente de la EDAR, y en menor medida con el PT (**Tabla 3**).

En relación con el IVF, se observa una relación directa entre este y el índice de estrés (**Figura 9**). Esta relación parece responder a la coincidencia en el tiempo de un aumento poblacional significativo de la bacteria filamentososa *Ca. Microthrix parvicella* (**Figura 10**), probablemente asociado a la entrada del vertido incontrolado a la EDAR, además de a las bajas temperaturas. Sin embargo, se necesitarían más estudios para confirmar esta tendencia.

#### 4. CONCLUSIONES

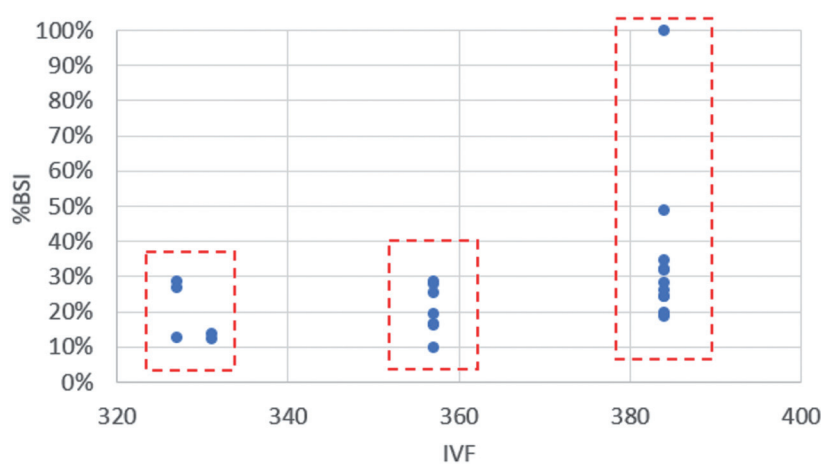
La obtención del índice de estrés de la biomasa presente en el fango activo (BSI), a partir de la tecnología ofrecida por Microplanet, es una medida precisa, fácil y rápida del estado de la misma. Gracias al equipo portátil y a la obtención de

» La obtención del índice de estrés de la biomasa presente en el fango activo (BSI), a partir de la tecnología ofrecida por Microplanet, es una medida precisa, fácil y rápida del estado de la misma, siendo una herramienta útil para los jefes de explotación de las plantas de tratamiento de agua

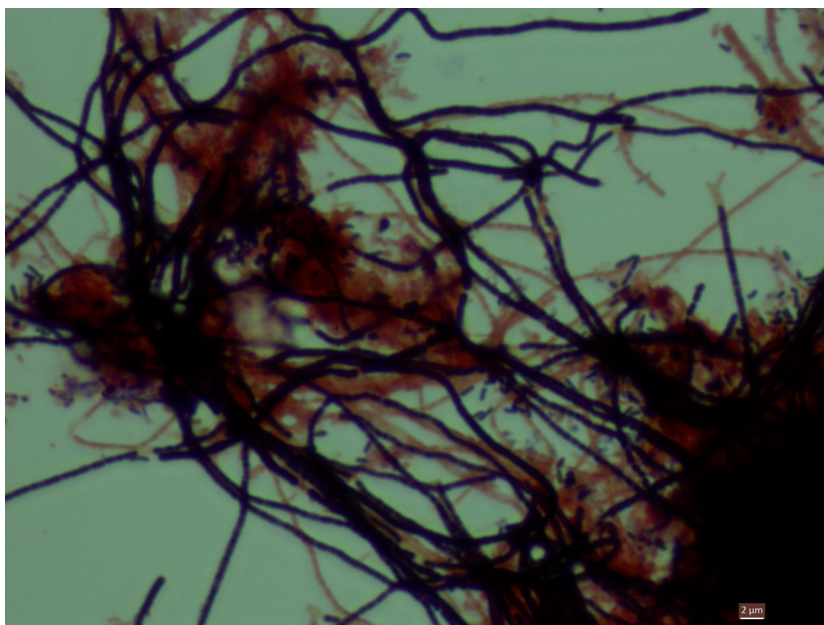
**TABLA 3**  
**CORRELACIONES PERASON.**

Parámetro	BSI (%)	AVSS	ABR
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> efluente	0,92	-0,54	-0,73
DQO efluente	0,43	0,07	-0,12
PT efluente	0,26	0,04	0,04
NT efluente	0,84	-0,42	-0,58
SSVLM	0,06	0,30	-0,28

**FIGURA 9.** Relación entre el índice volumétrico de fangos (IVF) y el índice de estrés de la biomasa presente en el licor mezcla.



**FIGURA 10.** Tinción Gram en la que se observa abundancia de Ca. *Microthrix parvicella* en el licor mezcla.



resultados en cuestión de minutos, la ATPmetría de segunda generación ATP2G de Microplanet pueda llevarse a cabo *in situ*, evitando el transporte de muestras y agilizando la toma de decisiones. Por tanto, es una herramienta útil para los jefes de explotación.

La medida del índice de estrés de la biomasa permite no solo diagnosticar una posible inhibición de la actividad microbiana, sino prever una posible afección, lo que permitiría la toma de medidas de control antes de producirse efectos sobre el afluente de la EDAR.

Sería recomendable realizar las estimaciones de la carga másica y optimizaciones de concentración de sólidos del sistema empleando el valor de AVSS, en vez del SSVLM, ya que estos engloban biomasa muerta y otros tipos de materia orgánica, o bien realizar estudios para dilucidar si la diferencia entre los sólidos activos y los volátiles es constante en el sistema.

**Bibliografía**

[1] APHA (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st Edition, American Public Health Association/ American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC.

[2] Arnáiz, C.; Isac, L.; Lebrato, J. (2000). Determinación de la biomasa en procesos biológicos I. Tecnología del Agua, núm. 205.

[3] Archibald, F.; Methot, M.; Young, F.; Paice, M.G. (2001). A simple system to rapidly monitor activated sludge health and performance. Wat. Res., núm. 35(10), págs. 2.543-2.553.

[4] Brault, J.M.; Whalen, P.; Stuart, P. (2011). Early warning signs of bulking in activated sludge reactors through systems analysis and interpretation of ATP data. Environmental Technology, núm. 32(13-14), págs. 1.649-1.660.

[5] Norman, P.; Whalen, P. (2009). A new method for upset prediction: ATP-based biomonitoring and statistical process analysis at two refinery wastewater plants. Paper presented at WEFTEC Conference & Expo.

[6] Golfe, R.; Baeza, A.; Tárrega, M.J.; Fayos, G.; Fajardo, V.; Zorrilla, F. (2014). Software para la cuantificación microbiológica del fango activo a partir del análisis de imagen. Tecnoaqua, núm. 8, págs. 64-71.