



UNIVERSIDAD DE GRANADA  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CIVIL, DEPARTAMENTO  
DE MICROBIOLOGÍA, INSTITUTO DEL AGUA

ELIMINACIÓN BIOLÓGICA DE  $\text{NO}_3^-$  DE AGUAS  
SUBTERRÁNEAS MEDIANTE FILTROS SUMERGIDOS:  
OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA.

*Miguel Angel Gómez Nieto*  
*Granada, 1998*

# UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CIVIL, DEPARTAMENTO  
DE MICROBIOLOGÍA, INSTITUTO DEL AGUA.



ELIMINACIÓN BIOLÓGICA DE  $\text{NO}_3^-$  DE AGUAS  
SUBTERRÁNEAS MEDIANTE FILTROS SUMERGIDOS:  
OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA.

Miguel Angel Gómez Nieto

Tesis Doctoral

1998

# **UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CIVIL, DEPARTAMENTO DE  
MICROBIOLOGÍA, INSTITUTO DEL AGUA.**

**Eliminación Biológica de  $\text{NO}_3^-$  de aguas subterráneas mediante filtros sumergidos:  
Optimización del sistema.**

Memoria presentada para aspirar al grado de Doctor  
por el Licenciado en Farmacia D. Miguel Angel Gómez Nieto.

Fdo. D. Miguel Angel Gómez Nieto.

Directores:

**Fdo. D. Ernesto Hontoria García**  
Catedrático de Ingeniería Sanitaria y Ambiental.  
E.T.S.I. Caminos, Canales y Puertos.  
Universidad de Granada

**Fdo. D. Jesús González López**  
Catedrático de Microbiología.  
Facultad de Farmacia.  
Universidad de Granada.

**Granada, 1998**

*Este trabajo ha sido financiado por el ProyectoAMB95-0621 de la comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología(Plan Nacional de I+D), el Programa Nacional de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia (Programa Sectorial de Formación de Profesorado Universitario y Personal Investigador AP93) y la Empresa E.M.A.S.A.G.R.A.*

*A lo largo de los cuatro años que ha durado esta investigación, he contado con la colaboración y aportación desinteresada de personas a las que quiero expresar mi más sincero agradecimiento.*

*En primer lugar a mis directores D. Ernesto Hontoria García y D. Jesús González López, dos investigadores de auténtico lujo, que han aportado sus amplios conocimientos en la materia, así como una constante colaboración y entusiasmo por este proyecto.*

*A la Dra. Concepción Calvo Sainz, a la cual no solo he de agradecer sus valiosos consejos, sino también mi inicio en la investigación.*

*Al Dr. Juan Manuel Cardenete López, Director de la Empresa Municipal de Aguas de Granada (EMASAGRA) durante gran parte de la época de realización del proyecto, por sus aportes científicos y por facilitar el trabajo, poniendo a mi disposición todos los medios tanto humanos como materiales precisados.*

*A todo el personal de la Estación Depuradora Puente de los Vados de Granada y en especial a D. Jose Luis Martín y D. José Martín por su estrecha colaboración en los trabajos realizados en la planta experimental.*

*Al Instituto del Agua de la Universidad de Granada y en especial a mis compañeros y amigos del grupo de Microbiología Ambiental: Luisa López, Clementina Pozo, M<sup>a</sup> Victoria Martínez, Florentina Saez, Juan Gálvez, Belén Juárez y Belén Rodelas, por estar siempre ahí, para lo que se les necesite y por sus constantes ánimos.*

*A todos los amigos y compañeros del Departamento de Ingeniería Civil: Begoña Moreno, Jorge Pérez, Francisco Osorio, Montserrat Zamorano, Jesús Beas, Vicente Redondo y Manuel Prados, por su aportación y valioso esfuerzo.*

*Al departamento de Bromatología de la Facultad de Farmacia y en especial a su directora M<sup>a</sup> Carmen López y los Drs. Rafael Jiménez y Javier Quesada, por sus aportes experimentales en el proyecto.*

*A D. Rafael López Fernández por sus valiosas e ingeniosas ideas.*

*y por último (aunque no por ello menos importante) a mi familia, por confiar en mí y por saber perdonar la falta de dedicación que todos ellos se merecen.*

*a mi Padre.*

## RESUMEN

---

La aplicación de la desnitrificación biológica mediante filtros sumergidos es un proceso viable, útil para eliminar el nitrato de aguas subterráneas contaminadas, posibilitando así su uso como agua potable. Estos sistemas precisan de un control del oxígeno disuelto en el agua a tratar y de la concentración de fuente de carbono adicionada.

Con la idea de optimizar el proceso, se realizó un estudio comparativo de tres fuentes de carbono (sacarosa, metanol y etanol) ensayando la influencia de su concentración y presencia de oxígeno disuelto, tanto en el rendimiento como en el crecimiento y composición de la biopelícula.

Estudios sobre la composición de bacterias desnitrificantes y su actividad, aportan conocimientos de la variación de estas y su influencia en el rendimiento del sistema. Los ensayos de variación de caudal y concentración de nitrato del influente, permiten optimizarlo en cuanto a sus parámetros de diseño.

## ABSTRACT

---

Biological denitrification by submerged filters is a viable process, useful for nitrate removal of contaminated groundwater, permitting its use as drinking water. This system need a control of dissolved oxygen and carbon concentration in the water in order to improve the final results of the process.

Three different carbon sources were applied in the present study for the optimization of the denitrification process. Thus sucrose, methanol and ethanol were added to the contaminated water under different oxygen conditions. Under these conditions yield, growth and biofilm were analyzed in detail.

Microbiological analysis of the denitrifying bacteria and its biological activity were also utilized for understand the effects of these parameters on the biological denitrification in submerged filters. Assays of flow variation and nitrate concentration in the effluent allow its optimization for the design parameters.

---

# Índice

---

<b>I. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>1. El ciclo hidrológico: Recursos de agua .....</b>	<b>2</b>
<b>2. Contaminación de aguas Subterráneas .....</b>	<b>3</b>
2,1. Contaminación de aguas subterráneas por $\text{NO}_3^-$ .....	4
2,2. Entrada de $\text{NO}_3^-$ en los acuíferos.....	6
2,2,1. Contaminación de acuíferos por prácticas agrícolas.....	6
2,2,2. Otros tipos de contaminación por nitratos .....	9
2,2,2,1. Aporte de nitrógeno por las precipitaciones .....	9
2,2,2,2. Aporte de nitrógeno por los residuos sólidos urbanos ..	9
2,2,2,3. Contaminación por aguas residuales depuradas y no depuradas.....	10
2,2,2,4. Aportes por residuos industriales .....	11
2,2,2,5. Aportes por actividades ganaderas .....	11
2,2,2,6. Aportes de origen natural .....	12
<b>3. Efectos adversos del nitrato en aguas .....</b>	<b>12</b>
3,1. Problemas sanitarios .....	12
3,1,1. Methemoglobinemia .....	14
3,1,2. Nitrosaminas .....	15
3,2. Eutrofización .....	16
<b>4. Ciclo del Nitrógeno .....</b>	<b>21</b>
4,1. Fijación de nitrógeno .....	22
4,2. Asimilación de nitrógeno .....	26
4,3. Amonificación .....	26
4,4. Nitrificación .....	27
<b>5. Desnitrificación .....</b>	<b>29</b>
5,1. Antecedentes históricos .....	29
5,2. Fases de la desnitrificación .....	31
5,2,1. Reducción de $\text{NO}_3^-$ a $\text{NO}_2^-$ .....	33
5,2,2. Reducción de $\text{NO}_2^-$ a $\text{NO}$ .....	35
5,2,3. Reducción de $\text{NO}$ a $\text{N}_2\text{O}$ .....	36
5,2,4. Reducción de $\text{N}_2\text{O}$ a $\text{N}_2$ .....	37
5,3. Los Desnitrificantes .....	38
5,4. Factores que afectan a la desnitrificación .....	41

---

---

5,4,1. Necesidades de un donador de electrones .....	42
5,4,2. Influencia del oxígeno.....	44
5,4,3. Presencia de óxidos de nitrógeno .....	47
5,4,4. Influencia del pH .....	48
5,4,5. Influencia de la temperatura .....	49
5,4,6. Otros efectos sobre la desnitrificación .....	50
<b>6. Tratamientos de aguas .....</b>	<b>51</b>
<b>7. Procesos biológicos de depuración .....</b>	<b>53</b>
7,1. Sistemas de biopelícula más empleados .....	55
7,2. Filtros sumergidos .....	57
<b>8. Biopelículas .....</b>	<b>59</b>
8,1. Estructura de las biopelículas .....	59
8,2. Composición microbiológica de la biopelícula .....	61
8,3. Composición química de la biopelícula.....	62
<b>II. Objetivos .....</b>	<b>65</b>
<b>III. Materiales y Métodos .....</b>	<b>71</b>
<b>1. Planta piloto .....</b>	<b>72</b>
1,1. Ubicación .....	72
1,2. Descripción de la planta piloto .....	72
1,3. Inoculación del sistema para la formación de la biopelícula .....	78
<b>2. Estudio comparativo de la influencia de tres diferentes fuentes de carbono en la capacidad de eliminación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> mediante filtros sumergidos .....</b>	<b>79</b>
2,1. Fuentes de carbono .....	79
2,2. Funcionamiento de la planta piloto .....	80
2,3. Estudio de la influencia del oxígeno .....	81
2,4. Toma de muestras .....	82
2,5. Determinación de aniones mediante cromatografía iónica .....	83
2,5,1. Descripción del cromatógrafo iónico .....	83
2,5,2. Preparación de los patrones .....	84
2,5,3. Preparación y análisis de las muestras .....	85
2,6. Determinación de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> .....	85

---

---

2,7. Análisis de las fuentes de carbono.....	87
2,7,1. Sacarosa.....	87
2,7,2. Determinación de etanol y metanol .....	88
<b>3. Estudio comparativo del tamaño y composición de la biopelícula desarrollada en el filtro biológico, empleando diferentes fuentes de carbono.....</b>	<b>89</b>
3,1. Condiciones de trabajo .....	89
3,2. Toma de muestra .....	89
3,3. Determinación del tamaño de la biopelícula .....	90
3,4. Recuento de bacterias heterótrofas capaces de crecer sin oxígeno (HAO) ..	91
3,5. Recuento de bacterias desnitrificantes .....	93
3,6. Recuento de reductores de nitrato.....	94
3,7. Conservación de cepas desnitrificantes .....	95
<b>4. Caracterización taxonómica y de la actividad de los microorganismos desnitrificantes aislados de la biopelícula .....</b>	<b>96</b>
4,1. Identificación taxonómica de las cepas desnitrificantes aisladas .....	96
4,1,1. Determinación de la presencia de la enzima citocromo oxidasa ....	97
4,1,2. Determinación de la producción de fluoresceína .....	97
4,1,3. Producción de poli-β-hidroxibutirato (PHB).....	98
4,1,4. Crecimiento a 40° C .....	98
4,1,5. Hidrólisis del almidón .....	98
4,1,6. Empleo de fuentes de carbono .....	99
4,2. Determinación de la actividad desnitrificante de las cepas aisladas .....	100
4,2,1. Preparación del medio de cultivo.....	101
4,2,2. Inoculación .....	102
4,2,3. Determinación del N <sub>2</sub> O .....	102
4,2,4. Recuento de bacterias por tubo .....	103
<b>5. Influencia de la carga de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en la capacidad de eliminación de nitrógeno por el filtro inundado, así como en la composición de la biopelícula.....</b>	<b>104</b>
<b>6. Influencia del caudal de agua de entrada en la capacidad de eliminación de nitrógeno por el filtro inundado, así como en la composición de la biopelícula.....</b>	<b>105</b>
<b>7. Análisis estadístico .....</b>	<b>105</b>
<b>IV. Resultados .....</b>	<b>107</b>
<b>1. Estudio de la influencia de la fuente de carbono .....</b>	<b>108</b>
1,1. Sacarosa .....	108

---

---

1,2. Metanol .....	111
1,3. Etanol .....	115
<b>2. Influencia del oxígeno .....</b>	<b>118</b>
2,1. Estudio del comportamiento del sistema, con incremento de fuente de carbono, en presencia de oxígeno .....	118
2,1,1. Sacarosa .....	118
2,1,2. Metanol .....	121
2,1,3. Etanol .....	125
2,2. Influencia de la concentración de oxígeno en la capacidad de eliminación de nitrato .....	128
2,2,1. Sacarosa .....	131
2,2,2. Metanol .....	131
2,2,3. Etanol .....	133
<b>3. Variaciones en el tamaño y composición de la biopelícula .....</b>	<b>135</b>
3,1. Sacarosa .....	135
3,1,1. Tamaño de la biopelícula .....	136
3,1,2. Heterótrofos capaces de crecer en ausencia de oxígeno (HAO) ....	137
3,1,3. Desnitrificantes .....	140
3,1,4. Reductores de nitrato .....	142
3,1,5. Matriz de correlación .....	145
3,2. Metanol.....	147
3,2,1. Tamaño de la biopelícula .....	147
3,2,2. Heterótrofos capaces de crecer en ausencia de oxígeno (HAO) ....	149
3,2,3. Desnitrificantes .....	151
3,2,4. Reductores de nitrato .....	154
3,2,5. Matriz de correlación .....	156
3,3. Etanol .....	158
3,3,1. Tamaño de la biopelícula .....	158
3,3,2. Heterótrofos capaces de crecer en ausencia de oxígeno (HAO) ....	161
3,3,3. Desnitrificantes .....	163
3,3,4. Reductores de nitrato .....	165
3,3,5. Matriz de correlación .....	167
<b>4. Identificaciones taxonómicas de las cepas desnitrificantes aisladas .....</b>	<b>169</b>
4,1. Sacarosa .....	170
4,2. Metanol .....	173
4,3. Etanol .....	176
<b>5. Actividad desnitrificante de las cepas bacterianas aisladas .....</b>	<b>179</b>

---

5,1. Sacarosa .....	183
5,2. Metanol .....	185
5,3. Etanol .....	189
<b>6. Influencia de la carga de nitrato .....</b>	<b>193</b>
6,1. Influencia de la variació de la carga superficial .....	193
6,2. Estudio a diferentes alturas de la influencia de la carga superficial .....	196
6,3. Variación del tamaño de la biopelícula en función de la carga superficial .....	202
6,4. Variación de los heterótrofos capaces de crecer sin oxígeno (HAO), en función de la carga superficial .....	204
6,5. Variación de las bacterias desnitrificantes en función de la carga superficial.....	205
6,6. Variación de la bacterias reductoras de nitrato en función de la carga superficial .....	207
<b>7. Influencia de la variación del caudal .....</b>	<b>209</b>
7,1. Influencia de la variació de la carga hidráulica.....	210
7,2. Estudio a diferentes alturas de la influencia de la carga hidráulica.....	213
7,3. Variación del tamaño de la biopelícula en función de la carga hidráulica.....	219
7,4. Variación de los heterótrofos capaces de crecer sin oxígeno (HAO), en función de la carga hidráulica.....	221
7,5. Variación de las bacterias desnitrificantes en función de la carga hidráulica.....	223
7,6. Variación de la bacterias reductoras de nitrato en función de la carga hidráulica.....	225
<b>V. Discusión .....</b>	<b>228</b>
<b>1. Influencia de la fuente de carbono .....</b>	<b>229</b>
<b>2. Influencia del oxígeno disuelto en el agua a tratar.....</b>	<b>236</b>
<b>3. Variaciones en el tamaño y composición de la biopelícula .....</b>	<b>243</b>
<b>4. Composición y actividad desnitrificante de la biopelícula .....</b>	<b>248</b>
<b>5. Influencia de la carga de nitrato y el caudal de trabajo .....</b>	<b>256</b>
<b>VI. Conclusiones .....</b>	<b>264</b>
<b>VII. Bibliografía .....</b>	<b>268</b>

## **I.- Introducción.**

---

## 1.- EL CICLO HIDROLÓGICO: RECURSOS DE AGUA.

El agua es la sustancia más abundante en la hidrosfera, encontrándose en los tres estados de la materia. Cerca del 96.5% de este agua está en los océanos, el 1.7% en los casquetes polares, otro 1.7% lo componen manantiales subterráneos y solo el 0.1% forman parte del sistema de agua superficial y atmosférico (Chow *et al*, 1994). El agua circula a través de un laberinto de caminos constituyendo el ciclo hidrológico, un ciclo constante sin principio ni fin.

Los recursos hídricos disponibles, tienen como único origen las precipitaciones (lluvia, nieve o granizo), que se originan tras la condensación de parte del vapor de agua atmosférico, que procede sobre todo de la evaporación de los océanos. Estas precipitaciones alcanzan un valor medio anual en España de 340121 Hm<sup>3</sup>, con oscilaciones entre los 280000 Hm<sup>3</sup> en años secos, hasta 444000 Hm<sup>3</sup> en años más húmedos (Hernández-Muñoz, 1990).

De la cantidad antes citada como precipitación media anual, solo 117394 Hm<sup>3</sup> es aportación, regulándose en la actualidad 45627 Hm<sup>3</sup>. Por otro lado hay que indicar que las precipitaciones infiltran anualmente 180000 Hm<sup>3</sup>, de los cuales solo se regulan 30000 Hm<sup>3</sup>. Parte de este agua queda en la zona no saturada que se evapotranspira a la atmósfera o bien alcanza la zona saturada, pasando a formar parte de los acuíferos.

La principal fuente de recursos hidrológicos en España es en la actualidad el agua superficial y una pequeña parte del agua subterránea. Las fuertes sequías han limitado mucho los recursos superficiales en los últimos años, lo cual obligó a emplear los recursos subterráneos, dentro de la gestión integral del agua. Estos recursos son sin duda una importante reserva de agua que suponen a nivel mundial 10530000 Km<sup>3</sup>, representando el 0.76% del agua total del planeta y un 30.1% del total del agua dulce ( UNESCO, 1978).

## 2.- CONTAMINACIÓN DE AGUAS SUBTERRÁNEAS

El constante desarrollo de la sociedad demanda cada vez mayores cantidades de agua, tanto para abastecimiento como para uso industrial y agrícola. Estas necesidades chocan con unos recursos limitados en zonas como España, afectadas en gran parte por prolongadas sequías. Esta escasez de agua motiva la búsqueda de nuevos recursos hídricos como es el caso de los acuíferos cuyo uso incontrolado da lugar a una serie de problemas, entre los que se pueden citar:

- Sobreexplotación, que afectaba ya en 1995 a 51 unidades hidrogeológicas, estando otras 23 en riesgo de padecerla. (Anom, 1995).
- Afecciones a cursos fluviales. Es consecuencia de lo anterior dándose importantes ejemplos como las Tablas de Daimiel y lagunas de Ruidera.
- Intrusión salina: ocasionada por la sobreexplotación de acuíferos litorales, que afectaba en 1995 a un 58 % de las unidades hidrogeológicas del litoral español.

Bien es verdad que estos dos últimos años, 96 y 97, de abundante pluviometría han paliado esta situación, pero estos problemas de sequía son los responsables de la pérdida de hábitats singulares, de la falta de agua para riego y en muchas ocasiones de la falta de agua para el abastecimiento doméstico, creando serios inconvenientes medio ambientales, sociales y económicos.

Junto a estos tres problemas ocasionados por un excesivo uso del agua de nuestros acuíferos, superior a la recarga natural, surge otro no menos importante como es la contaminación de aguas subterráneas. Esta contaminación a su vez se puede clasificar en dos tipos:

- *Puntual*: originada por un foco puntual.

- *Difusa*: cuando la entrada del contaminante se distribuye por una zona amplia del acuífero.

La contaminación puntual puede tener diferentes fuentes según Rice and Viste (1994), aunque su origen principal es de tipo urbano o industrial. Destaca la contaminación por derivados del petróleo procedentes de depósitos bien de uso doméstico o industrial, la contaminación por metales pesados procedentes de la filtración de lixiviados de vertederos, la contaminación por materia orgánica procedente de fosas sépticas o filtración de aguas residuales, etc.

La principal fuente de contaminación difusa son las prácticas agrícolas; a través de ellas pueden llegar a nuestros acuíferos innumerables sustancias, teniendo especial interés el nitrato y los pesticidas debido a sus efectos sobre la salud humana.

## **2,1.-CONTAMINACIÓN DE LAS AGUAS SUBTERRÁNEAS POR NO<sub>3</sub><sup>-</sup>**

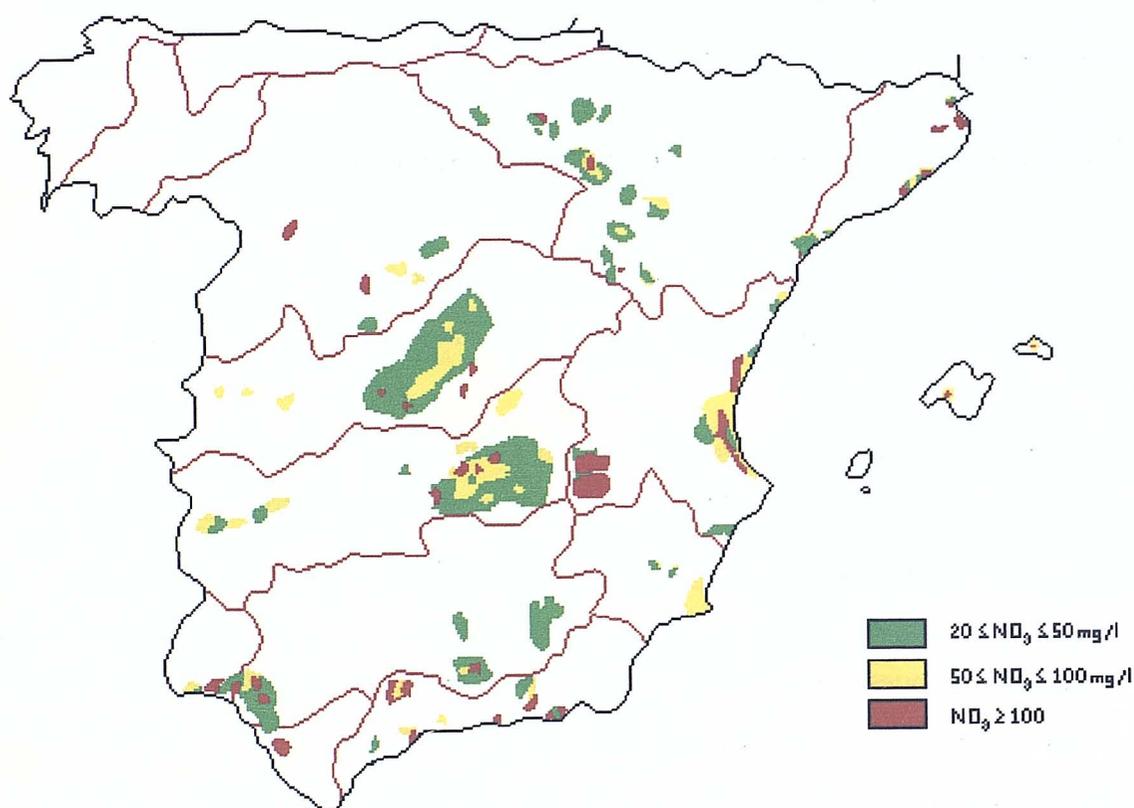
La Dirección General de Obras Hidráulicas estableció en 1991 tres niveles de deterioro de la calidad de las aguas subterráneas en función de la cantidad de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> presente:

- Contaminación incipiente con valores entre 20 y 50 mg/l.
- Contaminación establecida con valores que oscilan entre 50 y 100 mg/l.
- Alto grado de contaminación con valores superiores a 100 mg/l.

La figura 1 muestra la afección de la calidad de las aguas subterráneas para España en 1987. Estos valores han aumentado considerablemente en los últimos años, sobrepasando muchas zonas los 100 mg/l de modo espectacular. Tal es el caso del acuífero del río Vélez (Málaga); este acuífero con una superficie de 20.4 Km<sup>2</sup> se sitúa en una zona de intensa actividad agrícola con cerca de 4000 Ha. en regadíos. Hasta Agosto de 1994 se abastecían de este acuífero las poblaciones de Benamargosa, Benamocarra y Vélez Málaga, con una población total de 60000 habitantes, cesando su uso por el incremento en nitratos experimentado por el acuífero que pasó

en algunos puntos de 25 mg/l en Marzo de 1985 a 320 mg/l en Marzo de 1994 (García Aróstegui *et al*, 1996).

Ejemplos como éste se han repetido en toda la geografía española destacando zonas de Cataluña como el Maresme (Llobregat), Comunidad Valenciana, Mallorca, Llanura Manchega, Norte de Tenerife, Gran Canarias y los aluviales del bajo Guadalquivir.



---

**Figura 1. Mapa de contaminación por  $\text{NO}_3^-$  en España para 1987**

## 2.2.- ENTRADA DE $\text{NO}_3^-$ A LOS ACUÍFEROS

Las actuales prácticas agrícolas son las principales responsables del incremento de  $\text{NO}_3^-$  en los acuíferos, entre otras afecciones sobre el medio ambiente, sin embargo no es la única. Hay otra serie de vías naturales y antropogénicas que aportan cantidades elevadas de nitrógeno a nuestro subsuelo. Dentro de estas otras vías de origen humano, podemos encontrar los lixiviados procedentes de vertederos, actividades ganaderas o actividades industriales (Sanchís, 1990).

### 2.2.1.- Contaminación de acuíferos por prácticas agrícolas.

En la última década, las prácticas agrícolas han evolucionado buscando mejores rendimientos de los espacios cultivados y mayor rentabilidad. Esta evolución ha cambiado los métodos artesanales por otros más industrializados, en los que se emplean nuevos sistemas de plantación y regado así como nuevas prácticas de fertilización de los terrenos, pesticidas, manipulación genética, etc... Todas estas prácticas han convertido a la agricultura en una de las principales fuentes de contaminación, no puntual, del planeta que afectan al suelo, agua y aire, originando problemas como la erosión del terreno, eutrofización o contaminación del agua.

Una de las principales fuentes de contaminación del agua es la fertilización del terreno mediante el uso de abonos químicos, disminuyendo los de origen animal (Braide and Trattner, 1997). La proporción de fertilizantes, el tiempo de empleo, el método empleado o el tipo de fertilizante usado, determinan el grado de contaminación. Uno de los principales causantes de contaminación es el uso de elementos nitrogenados, cuya presencia en el agua dependerá del uso exclusivo en la agricultura, meteorología de la zona, permeabilidad del terreno, etc, siendo causantes de problemas tales como la eutrofización de aguas superficiales, o excesos de  $\text{NO}_3^-$  en las aguas subterráneas, factibles de su utilización en abastecimientos a núcleos urbanos.

En la I Guerra Mundial se logró sintetizar químicamente el  $\text{NO}_3^-$  mediante el proceso de Haber-Bosch. Tras su síntesis surge una importante industria productora de nitrato con fines

bélicos. Tras la guerra esta industria sufrió un cambio transformándose en productora de fertilizantes agrícolas los cuales comienzan a emplearse de modo masivo e incontrolado, debido a sus efectos beneficiosos en la agricultura. Surge así un incremento en su uso que multiplica por 4,75 la cantidad empleada en la Unión Europea desde 1955 a 1982 (Worthington, 1987). Ciertamente el empleo de estos fertilizantes químicos aumenta la producción de los cultivos (ECETOC, 1988), pero también es cierto que hay un punto óptimo a partir del cual el rendimiento no mejora, sino que incluso puede descender (Ramos, 1987). a pesar de esto, la tendencia de los agricultores es hacia una mayor dosificación, alentados por la posible mayor producción, los fabricantes y distribuidores.

Los componentes nitrogenados que más frecuentemente se encuentran en los fertilizantes son el  $\text{NH}_4^+$ , el  $\text{NO}_3^-$  y la Urea, tal y como se puede apreciar en la tabla 1. Estos compuestos una vez adicionados al suelo, son captados por la planta según el tipo de cultivo y de sus necesidades. Si esta fertilización se hace en exceso, el suelo se enriquece en estos compuestos nitrogenados que pueden ser arrastrados por el agua. De los tres compuestos anteriormente descritos, el que más aparece en los lixiviados del terreno es el  $\text{NO}_3^-$ , debido a su mayor solubilidad. El destino final de estos compuestos lavados del terreno suelen ser las aguas subterráneas.

Muchos han sido los estudios realizados sobre la contaminación de acuíferos por  $\text{NO}_3^-$  en todos los puntos del continente. Dentro de la propia Comunidad Andaluza podemos citar casos como el estudiado por Espinosa *et al* (1996) en el Campo de Dalias donde afirma que el incremento en nitratos dado en acuíferos profundos se debe principalmente a la agricultura. Un caso semejante estudiaron Grande *et al* (1996) en el acuífero Ayamonte-Huelva donde se registraron valores hasta de 400 mg/l de  $\text{NO}_3^-$ , originando el cese del abastecimiento para poblaciones como la de Lepe en 1989 que captaba el agua de dicho acuífero. Otro ejemplo se registró en las poblaciones de Vélez-Málaga, Benamargosa, Benamocarra y Torre del Mar, que cesaron en 1994 de abastecerse de las aguas del acuífero del río Vélez (García-Aróstegui *et al*, 1996) donde se llegaron a registrar valores de hasta 300 mg/l.

**Tabla 1.- Composición de los principales fertilizantes empleados.**

---

**FERTILIZANTES SIMPLES**

Amoniaco	$\text{NH}_4\text{OH}$
Sulfato Amónico	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Nitrosulfato Amónico	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + (\text{NH}_4)\text{NO}_3$
Nitrato Amónico	$\text{NH}_4\text{NO}_3$
Urea	$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$
Nitrato Amónico Cálcico	$\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{CaCO}_3$
Nitrato de Chile	$\text{NaNO}_3$
Nitrato Cálcico	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
Nitrato Magnésico	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$

**FERTILIZANTES BINARIOS**

Fosfato monoamónico	$\text{H}_2\text{NH}_4\text{PO}_4$
Fosfato diamónico	$\text{H}(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$
Nitrato potásico	$\text{KNO}_3$

**FERTILIZANTES TERNARIOS:** Presentan varias fórmulas químicas conteniendo diferentes porcentajes de N-P-K-Mg

---

El uso abusivo e incontrolado de fertilizantes en la agricultura, se destaca hoy en día como el principal agente causante de la contaminación por  $\text{NO}_3^-$  de nuestros acuíferos, sin embargo hay que destacar que otros aspectos, como las características y composición del suelo, la irrigación del terreno o la pluviometría, que pueden influir en el mayor o menor arrastre de  $\text{NO}_3^-$  hacia los acuíferos (Hamilton y Helsel, 1995). Otro fenómeno a tener en cuenta son los procesos de desnitrificación en suelos, más abundantes en presencia de fuentes de carbono, que pueden eliminar parte del  $\text{NO}_3^-$  presente (Adelmon y Tabidin, 1996).

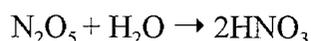
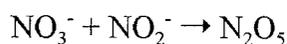
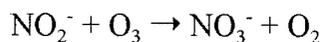
### **2.2.2.- Otros tipos de contaminación por nitratos.**

#### **2.2.1.1- Aporte de nitrógeno por las precipitaciones.**

La presencia de compuestos nitrogenados en la atmósfera procede principalmente de las emisiones industriales en forma de óxidos de nitrógeno (NOx). Lloyd y Heathcote (1985) consideraban que su procedencia provenía de la oxidación del nitrógeno en el funcionamiento de los motores, según la reacción:



La presencia del ácido nítrico en la atmósfera junto con otros como el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> forma la lluvia ácida que puede afectar al pH del suelo y llegar como no a aguas de lagos o aguas subterráneas. Este ácido nítrico puede formarse también en la atmósfera por una reacción fotolítica, a partir de NOx (Gupta *et al* 1986):



La concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el agua de lluvia es muy variable y dependerá de la zona y sobre todo de la actividad industrial, oscilando según Custodio y Llamas (1976) entre valores inferiores a 2 mg/l y 20 mg/l en zonas industriales.

Otra forma de aporte de nitrógeno a la atmósfera es de origen orgánico, fundamentalmente el polen de regiones arbóreas (Fried, 1985).

#### **2.2.1.2- Aporte de nitrógeno por los residuos sólidos urbanos.**

Según Sanchís (1990) se puede estimar que una tonelada de residuos sólidos urbanos

proporcionan unos 275 g. de nitrógeno. Este nitrógeno puede llegar a las aguas subterráneas, proceso que está unánimemente aceptado (I.T.G.M.E. 1989). Este aporte es causado principalmente por los lixiviados procedentes del vertedero, por varias causas como sobresaturación, mal sellado del vaso, defectos de ejecución de los drenajes etc.

Hay que tener en cuenta que el mayor o menor grado de contaminación de un acuífero por un vertedero dependerá del tratamiento que recibe este (controlado e incontrolado), de las condiciones climáticas e hidrológicas, de las características hidrogeológicas de la zona, entre otras. Es evidente que el gran número de vertederos incontrolados que existen no están sellados y la mayoría carecen de servicio, por lo que agudizan el problema.

Lógicamente al ser los lixiviados un medio reductor, el principal aporte de nitrógeno será en forma de  $\text{NH}_4^+$ . Este  $\text{NH}_4^+$  al alcanzar un medio oxidante como es el agua no contaminada pasaría fácilmente a  $\text{NO}_3^-$ . Un ejemplo de este tipo de contaminación fue observado por Custodio (1981) en el acuífero de Garraf, que comprobó que cerca del vertedero el acuífero presenta concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  elevadas y en zonas alejadas aparecen ya concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  que llegaban a valores de 28 mg/l.

#### 2.2.2.3- Contaminación por aguas residuales depuradas y no depuradas.

La Directiva 91/271 de la U.E. obliga a las poblaciones superiores a 2000 habitantes equivalentes de los países miembros a tratar sus aguas residuales e indica las características del vertido en lo que respecta a la  $\text{DBO}_5$ , DQO y SS, haciendo referencia a los nutrientes (N y P) sólo en caso de vertido a zonas sensibles. Estos tratamientos exigidos son procesos de oxidación por lo que el nitrógeno presente en el agua residual se transformará mayoritariamente en  $\text{NO}_3^-$  (forma más oxidada del nitrógeno). Atendiendo a esto, parece lógico indicar que un agua residual depurada mediante tratamiento biológico, puede contener cierta cantidad de nitrato. Muchos autores han tratado de indicar los valores de Nitrógeno que una persona aportaría al agua, oscilando éstos entre 4 y 5 Kg N/persona/año (Porter, 1980; López, 1982; Fried, 1985).

En la actualidad se pretende la gestión integral del uso del agua, demandados por los diferentes planes hidrológicos de cuenca, así como por el Plan Nacional, que unido a una propuesta de directiva sobre reutilización se pretende dar la posibilidad de volver a usar las agua depuradas. Atendiendo a los diferentes usos posteriores del agua, aparecen distintos procesos de afino, pretendiendo con ello ajustar calidades a usos.

El problema de los  $\text{NO}_3^-$  solo aparece en vertidos de aguas próximos a captaciones, de aquí que en estos casos se exija a las estaciones depuradoras la eliminación del nitrógeno, o bien en vertidos próximos a estuarios, lagos o embalses (zonas sensibles) donde se demanda la minimización de nutrientes en los efluentes.

De cualquier forma el uso de las aguas depuradas, pues con el cumplimiento de la directiva 271/91 desaparece el vertido directo, en regadío no llega a contaminar acuíferos, puesto que la utilización de sistemas de riego elimina los excesos y el nitrógeno aportado es insuficiente en la mayoría de los casos para la demanda del cultivo.

#### 2.2.2.4.- Aportes por residuos industriales.

Según Fried (1985) las industrias más contaminantes en cuanto al aporte de nitrógeno son: mataderos, destilerías, azucareras, textiles e industrias de levaduras, almidón y algunas químicas. Dentro de todas ellas destacarían las destilerías llegando a valores de 1900 mg/l de  $\text{NO}_3^-$  en sus vertidos o los mataderos que pueden llegar hasta 1500 mg/l. A la mayoría de estas plantas se les exige la implantación de una estación depuradora, que minimizaría el problema, o bien son vertidas a la red de saneamiento urbano, quedando regulado el vertido a las condiciones de dicho núcleo.

#### 2.2.2.5.- Aportes por actividades ganaderas.

Toda concentración ganadera genera grandes cantidades de orina y excrementos que

presentan una importante carga de nitrógeno. Estos residuos suelen almacenarse o bien aportarse al terreno mediante el estercolado. Estas prácticas han dado lugar a problemas no puntuales de contaminación por arrastre del nitrógeno de los residuos en los lixiviados, sobre todo cuando se realiza en exceso. Casos como estos fueron descubiertos en los ríos de Gales por Knappert y Oskan (1987).

Un caso concreto de contaminación por  $\text{NO}_3^-$ , debido a las prácticas ganaderas, se ha registrado considerablemente en las provincias de Badajoz, Granada, Salamanca o Soria al igual que en numerosos puntos de Europa. Estos problemas se han debido a la industrialización de la ganadería porcina, con una posterior aplicación sobre el terreno de los purines procedentes de esta industria.

#### 2.2.1.6.- Aportes de origen natural.

Aunque sus valores e importancia son difíciles de cuantificar hay que citar en este apartado el aporte natural de nitrógeno al suelo dado por la Fijación de Nitrógeno. Este proceso conocido desde muy antiguo fue empleado en muchas ocasiones para enriquecer el suelo en nitrógeno (López, 1982).

Otros fenómenos puntuales pueden ser el lavado de minerales del terreno, como el caso del Condado de El Fresno en California donde se alcanzaron 1150 mg de  $\text{NO}_3^-$  / l en el acuífero por su origen mineral.

### **3.- EFECTOS ADVERSOS DEL NITRATO EN EL AGUA**

#### **3.1.- PROBLEMAS SANITARIOS**

Podemos fijar la fecha de 1895 como la primera descripción de un caso mortal por ingesta

de nitrato. La muerte de ejemplares de ganado bovino se asoció con el consumo de grandes cantidades de maíz verde, debido al alto contenido de nitrato potásico que éste contenía. Ya en 1940 se identificó el nitrato como el verdadero causante de las muertes al acumularse en los forrajes verdes y transformarse en nitrito en el rumen de estos mamíferos. Poco después, en 1945, Comly describió la sintomatología de la methemoglobinemia infantil y la relacionó con la ingesta de nitrato del agua de pozo, iniciándose una larga controversia sobre la toxicidad de este anión. La inquietud aumentó cuando Magel y Barnes (1956) evidenciaron la síntesis a partir del nitrito y las aminas de la dimetilnitrosamina, una nitrosamina potencialmente cancerígena. Tras estos descubrimientos, otros muchos autores han relacionado la ingesta de nitrato con otras patologías, pero la Organización Mundial de la Salud (W.H.O., 1985) las rechazó, aceptando sólo la methemoglobinemia y cáncer por nitrosaminas como efectos de alta ingesta del nitrato.

Los nitratos son muy estables y no son en absoluto tóxicos, tan sólo se les reconoce un marcado efecto diurético, lo cual los llevó a emplearlos como terapéutico desde el siglo XVII. Los efectos tóxicos que se les pueden achacar son debidos a una ingesta masiva o por su transformación en nitrito (Fritsch y De Saint Blanquat, 1990). Su metabolismo es sobradamente conocido: se absorben rápidamente a nivel intestinal, una pequeña parte se recicla a nivel enterohepático y salivar y se eliminan rápidamente por vía urinaria (Fritsch, 1982). El principal peligro reside en su transformación en nitrito. Esta reducción es realizada por una enzima, la Nitrato reductasa, presente en plantas y bacterias. El pH óptimo para la actividad de esta enzima es 6.0 a 6.4, que sólo se da en la cavidad bucal. En el resto del tubo digestivo es difícil obtener este pH, a no ser en el caso de patologías tales como aclorhidria gástrica y sobre todo en enteritis graves con un fuerte desarrollo de flora bacteriana.

Por otro lado, hay dos categorías de organismos donde si se alcanza este pH:

- Los rumiantes con un pH neutro en el rumen y abundante flora bacteriana, por lo que un exceso de nitrato les puede producir la muerte, tras una masiva formación de nitrito, por methemoglobinemia.

- Los bebés hasta los cuatro meses (Klaassen *et al*, 1986).

### 3.1.1.- Methemoglobinemia

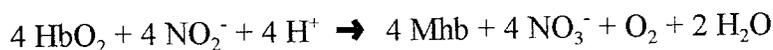
La hemoglobina es una heteroproteína de los eritrocitos, constituida de una parte proteica (globulina) y un grupo prostético (el grupo Hemo). En la parte central del grupo prostético aparece un átomo de hierro que para realizar su función de pigmento respiratorio precisa estar en estado ferroso (Sánchez de Medina *et al*, 1992).

La methemoglobinemia se puede definir como una acumulación anormal de methemoglobina en los eritrocitos. Esta methemoglobina es una forma anormal de hemoglobina en la que el hierro está en forma férrica y no puede realizar la función de pigmento respiratorio. Este proceso se puede dar de forma natural pero la diaforasa de los glóbulos rojos la reduce al estado ferroso. El problema se produce cuando las causas no son naturales. Hay diversos tipos de methemoglobinas (Jaffe, 1981), siendo la molecular una de las más graves. Otro tipo es la producida por los denominados venenos methemoglobinizantes, tales como los percloratos, aminofenoles, fenacetinas, anilinas, sulfamidas y nitritos (Fried, 1985).

El mecanismo de formación de la methemoglobina es poco conocido, pero se estima que sucede en dos fases:

- Conversión de oxihemoglobina en methemoglobina según la concentración de nitrito.
- Formación del complejo methemoglobina - nitrito con posterior liberación de nitrato.

Estas reacciones se producen según Doyle *et al* (1985) siempre que  $\text{NO}_2^-/\text{HbO}_2 > 8$ .



La sintomatología es fundamentalmente cianosis que variará según la cantidad de

methemoglobina presente en los glóbulos rojos. La cianosis se nota a partir del 10% de methemoglobina. Sobre el 20% aparecen cefaleas, vértigos, taquicardia, astenia, etc. Sobre el 60% ya da síntomas neurológicos y con valores superiores al 70% puede producir la muerte.

Este proceso puede frenarse por una neutralización del nitrito con sustancias como Vitamina C ó E, sulfamato o ciertos antioxidantes (Mirvish, 1983), o en casos más graves usar el azul de metileno por vía endovenosa (Cornblath y Hartman, 1948).

Como se ha indicado anteriormente, es mucho más grave en bebés por una serie de causas:

- La hemoglobina del recién nacido es un 70% hemoglobina fetal, que es muy oxidable.
- En los primeros días, el estómago no tiene ácido clorhídrico libre y el pH es casi neutro.
- En casos de infección enteral, hay una fuerte proliferación de Escherichia coli con gran poder nitritogénico.

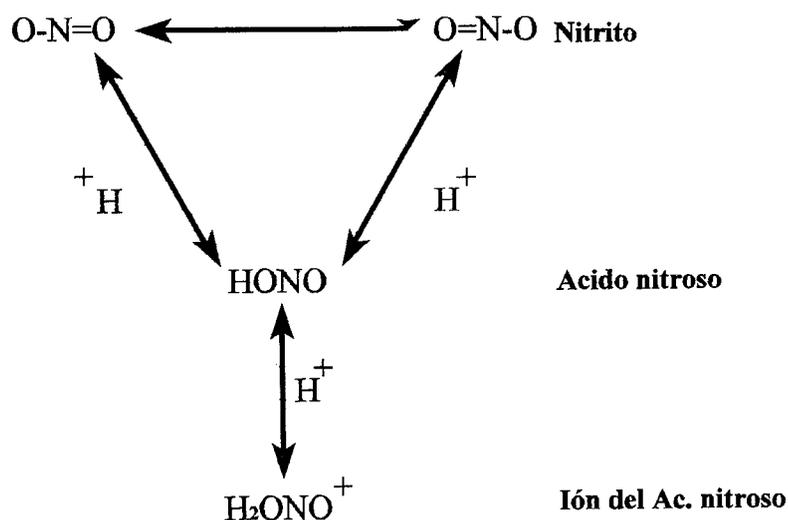
### **3.1.2.- Nitrosaminas**

La formación de nitrosaminas se produce por la reactividad del ión  $\text{NO}^-$  procedente del  $\text{NO}_2^-$ , tal como se puede observar en las figuras 2 y 3.

El ión nitrito en medio acuoso puede sufrir sucesivas protonaciones formando ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) el cual a su vez forma el ión del ácido nitroso ( $\text{H}_2\text{ONO}^+$ ) el cual se puede descomponer en tres compuestos. De los tres compuestos el halogenuro de nitrosilo, formado fácilmente con la presencia de halógenos, es capaz de reaccionar con una amina bien secundaria o terciaria dando una nitrosamina.

Para la producción de nitrosaminas, se precisa que coincidan diverso factores. Por un lado es necesaria la presencia de nitrito así como de aminas, las cuales pueden obtenerse por la

alimentación o por la medicación y por otro lado, se precisa un pH ácido. Es por ello que el único lugar del organismo donde pueden coincidir estos tres factores es el estómago y solo allí se pueden producir las nitrosaminas ( Mirvish, 1977).



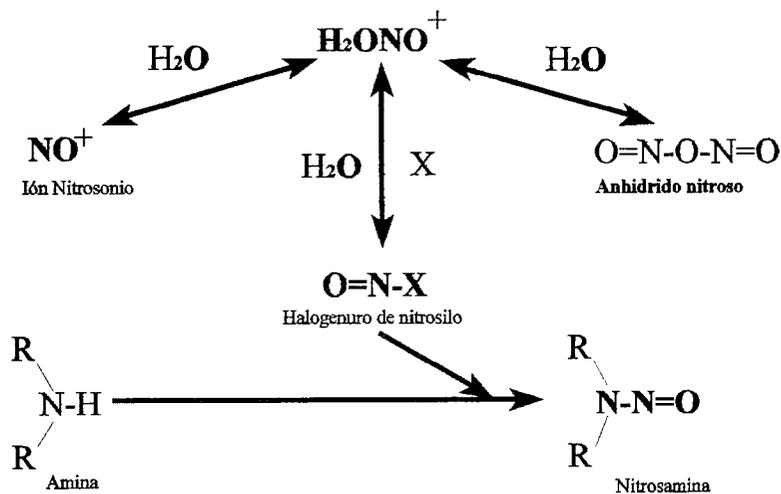
**Figura 2. Formación del ión del ácido nitroso a partir de nitrito y en medio ácido**

No hay evidencias de cual es la dosis de nitrosaminas capaz de producir cáncer de estómago; algunos autores estiman que se puede formar sobre  $7\mu\text{g}/\text{día}$  de nitrosamina por el proceso anteriormente descrito, ahora bien el hecho de que estas dosis produzcan cáncer en humanos es hipotético. Lo que sí es sobradamente conocido es la capacidad de producir tumores de estos compuestos, que en animales de experimentación ronda el 75% de los casos ensayados (Chambon *et al* , 1983).

### 3.2.- EUTROFIZACIÓN

Todo ecosistema lótico (masa acuosa estancada), desde su formación, pasa por una serie

de fases evolutivas hasta que desaparece. Estas fases fueron clasificadas inicialmente por el botánico sueco Naumann (1919) en función de las concentraciones de P, N y Ca presentes en dicha masa acuosa, considerándola como oligotrófica si contiene bajas concentraciones de estos nutrientes, mesotrófica para concentraciones intermedias y eutrófica para altas concentraciones. Según esto, la eutrofización es una fase natural de un ecosistema lótico a la cual se llega de forma evolutiva y que puede tardar miles de años en alcanzarse. Los diferentes aportes de agua arrastran sólidos, nutrientes, materia orgánica etc, que se acumula y enriquece el agua. Las masas acuosas cerradas, como los lagos, acumulan estos compuestos dando lugar a las diferentes fases.



**Figura 3. Formación de nitrosaminas a partir del ión del ácido nítrico**

Estos procesos evolutivos se ven alterados por la intervención humana. Los vertidos de aguas residuales, la actividad industrial y los nutrientes empleados de forma masiva en la agricultura, pueden llegar hasta los ecosistemas lóticos enriqueciéndolos en nutrientes más rápidamente y acelerando el proceso evolutivo a solo unos pocos años.

La eutrofización artificial es un problema que comenzó a reconocerse por la comunidad científica entre los años 40 y 50, llegando a considerarse como uno de los mayores y más extendidos problemas que afectan al agua dulce, principalmente lagos, estuarios o aguas costeras. Harper (1992) la definió como el efecto biológico de un incremento en la concentración de nutrientes, fundamentalmente N y P, en ecosistemas acuáticos, aunque se consideran también las concentraciones de otros nutrientes como K, Ca, Si, Mn y Fe.

Una consecuencia directa del incremento en la concentración de estos nutrientes es el crecimiento masivo de los productores primarios. El crecimiento de estos productores se ve limitado por la intensidad de la luz, la temperatura y los nutrientes. Precisan luz que aporte energía a los procesos de reducción de CO<sub>2</sub> a partir de los cuales se sintetizan compuestos orgánicos, precisan unos valores de temperatura óptimos para la actividad enzimática y una serie de nutrientes que pueden estar limitados en la naturaleza ( Hutchinson, 1973). Tanto el P como el N se han considerado como nutrientes limitantes para el crecimiento de la biomasa en ecosistemas acuáticos (Thomas, 1969; Viner 1975), estando el P más limitado. La no limitación de estos nutrientes por sus aportes al agua, principalmente por acción humana, y la coincidencia de valores óptimos de luz y temperatura provoca este crecimiento masivo de productores primarios.

Como consecuencia de este efecto directo, surgen otros efectos indirectos que afectan a todas las comunidades presentes en la masa acuosa así como a las propiedades físico-químicas del agua, llegando a afectar negativamente al ser humano.

Dentro de estos efectos indirectos podemos citar el descenso de la biodiversidad de todas las comunidades, especialmente de los productores primarios. Cada especie presenta ciertas limitaciones para su crecimiento que las mantienen en equilibrio, siendo una limitación común la concentración de P y N. La presencia de altas concentraciones de estos nutrientes hace que se dispare el crecimiento de todos los productores primarios compitiendo entre ellos y destacando los que presenten menos limitaciones para otros factores, dando lugar a un descenso de la biodiversidad. En estas condiciones, organismos como las cianobacterias predominan sobre los

demás, ya que presentan propiedades como la posibilidad de acumular P, capacidad para fijar N<sub>2</sub>, precisan menos intensidad de luz para realizar fotosíntesis o tienen mayor capacidad de captar CO<sub>2</sub>. Estas propiedades hacen que las cianobacterias proliferen más rápidamente que el resto de productores primarios, desfavoreciendo a su vez el crecimiento del resto (Shapiro, 1990).

Estos incrementos de cianobacterias, denominados también como "Blooms", son los responsables de fenómenos de estratificación de lagos. La estratificación sucede principalmente en lagos con una profundidad superior a 10 metros, en épocas o zonas en la que la temperatura y la intensidad de la luz es adecuada para el crecimiento de los productores primarios. Se presentan en estos casos una zona superficial denominada epilimnio muy diferenciada de las capas profundas o hipolimnio, así como una capa intermedia denominada mesolimnio (Brierley, 1985).

El epilimnio es una zona rica en oxígeno y con alta intensidad de luz donde hay una gran producción primaria. Debido a esto el oxígeno es consumido completamente en las capas superficiales y no dejan pasar la luz, por lo cual las capas inferiores son zonas anóxicas, donde predomina un ambiente reductor y donde se dan procesos de descomposición de la materia orgánica procedente de las capas superiores así como fenómenos de sedimentación.

Las condiciones de estratificación afectan a todas las comunidades presentes en el ecosistema lenítico. Así en las capas superficiales desaparecerán los productores primarios que tengan mayores requerimientos para su crecimiento y en las capas más profundas desaparecerán las algas unidas al sustrato al no llegarles la luz.

Otro factor que altera la supervivencia de ciertas comunidades es la limitación de oxígeno. Las especies que no toleran bajas tensiones de oxígeno desaparecen. Esto afecta al zooplacton, bentos e incluso a los peces (Jónasson, 1969). La ausencia de oxígeno da lugar a un ambiente reductor donde predominan bacterias anaerobias que generan malos olores y producen compuestos solubles de N, P, Fe o Mn.

Por otro lado hay que considerar que en el hipolimnio hay mayor abundancia de materia orgánica, dando lugar a una zona de descomposición donde pueden predominar nuevas especies de todas las comunidades presentes en la masa acuosa. Esto afecta a los peces los cuales mantienen su biomasa gracias a la riqueza en alimento pero varían las especies, predominando otras de menor interés económico (Regier and Hartman, 1973).

Todo este conjunto de cambios producidos en los ecosistemas lóticos, como consecuencia del incremento de la concentración de nutrientes, afecta directamente a los usos que de dicha masa acuosa tenga el ser humano. Las principales reservas de agua son sistemas lóticos artificiales que pueden sufrir los mismos procesos que un lago natural. La eutrofización de un embalse de agua puede generar importantes problemas sociales y económicos.

El agua una vez captada es tratada, previo a su empleo para abastecimiento de núcleos urbanos, para lo cual debe cumplir con unos requisitos determinados. Un agua procedente de un embalse eutrofizado precisa de mayores tratamientos además de generar una serie de problemas tales como (Hayes y Greene, 1984):

- Posibilidad de quelación de compuestos de Al y Fe adicionados en los procesos de coagulación, con mucopolisacáridos procedentes de la rotura celular de las algas. Estos compuestos pueden precipitar a bajos pH causando problemas a algunas industrias. Por otro lado incrementan las concentraciones de Al en el agua de abastecimiento, lo cual puede ser causante de enfermedades.

- Hay acumulación de compuestos reducidos solubles como el  $\text{NH}_4^+$  que afecta a la capacidad de desinfección del cloro, o bien sales de Fe y Mn que pueden causar problemas de decoloración de la ropa en el lavado o problemas de incrustaciones al oxidarse.

- Se pueden formar compuestos orgánicos halogenados con el cloro empleado en la desinfección, productos considerados como cancerígenos.

- Hay problemas de olores causados por la putrefacción de la materia orgánica, lo cual precisa tratamientos mediante filtros de carbón activo para eliminarlos.

Otro importante problema se puede presentar por la producción de toxinas por parte de las cianobacterias o dinoflagelados. Actualmente se reconocen 25 especies de cianobacterias capaces de producir toxinas tales como neurotoxinas o hepatotoxinas que pueden causar la muerte de aves, mamíferos, anfibios y peces. Estas toxinas pueden llegar al ser humano por el consumo de estas aguas o por el consumo de animales que las tomaron del agua (Edington and Edington, 1986).

A estos problemas hay que sumarles otros como la limitación de usos de las masas acuosas para la pesca por la pérdida de especies económicamente importantes o pérdida de atracción de la zona para actividades recreativas

Como es lógico este tipo de problemas causados por un aporte antrópico de N y P, deben evitarse, limitando en todo lo posible la entrada de estos nutrientes a los ecosistemas leníticos.

#### **4.- CICLO DEL NITRÓGENO**

El Nitrógeno es uno de los elementos más abundantes de la biosfera, constituyendo entre el 8 al 10% de la materia viva (peso seco) y llegando a formar parte de los compuestos orgánicos imprescindibles para la vida como son : ácidos nucleicos, proteínas (donde destacan las enzimas) o lipoproteínas (Martínez-Toledo, 1992).

Las plantas y animales, así como la mayoría de los microorganismos, dependerán para su nutrición de una fuente de nitrógeno combinado, el cual se presenta como amoníaco, nitrato o compuestos orgánicos nitrogenados. Estas formas de nitrógeno son bastante escasas, por lo que constituyen un factor limitante para el desarrollo de los organismos vivos (Stainer *et al*, 1988).

Todo el nitrógeno presente en la naturaleza se encuentra en equilibrio y solo por una serie de transformaciones biológicas, físicas o químicas puede transformarse, variando así el porcentaje de sus diferentes formas químicas (Hutzinger, 1982).

La forma más abundante es el  $N_2$ , presente en la atmósfera en casi un 80% (Stainer *et al*, 1988), sin embargo esta forma no es asimilable y precisa transformarse para ello. El  $N_2$  es la molécula diatómica más estable conocida, precisando para su disociación 225 Kcal/mol que solo pueden proporcionarse por fuertes descargas eléctricas o altas presiones y temperaturas (Payne, 1981). Es por ello lógico pensar que esta barrera energética puede salvarse en la naturaleza por reacciones catalizadas enzimáticamente, que dan lugar a una serie de transformaciones y combinaciones que forman el denominado Ciclo del Nitrógeno (Figura 4).

#### 4.1.- FIJACIÓN DE NITRÓGENO

La fijación de nitrógeno es el proceso biológico mediante el cual el  $N_2$  es transformado en  $NH_4^+$ . Esta transformación es la principal entrada de nitrógeno de la biosfera y supone aproximadamente 180 millones de toneladas al año (Martínez-Toledo, 1992). Este proceso biológico no es la única entrada, ya que por fenómenos naturales, como los rayos de tormentas ó la luz U.V. se puede transformar el  $N_2$  en nitrógeno asimilable, aunque en un valor más insignificante que no llega a más del 0.5% del total (Stainer *et al*, 1988).

La capacidad de fijar nitrógeno, no ha sido descrita hasta hoy en ningún organismo eucariota, por lo que parece estar restringida solo a algunos procariotas denominados diazotrofos (Sprent *et al*, 1987). Actualmente estas bacterias se agrupan en 39 géneros muy heterogéneos y alejados entre si filogenéticamente, aunque los genes responsables de la fijación de nitrógeno están altamente conservados lo cual indica un origen común (Martínez-Molina y Velazquez, 1992).

La fijación biológica de nitrógeno es realizada gracias a un complejo enzimático denominado nitrogenasa. Actualmente se conocen tres formas de nitrogenasa, genéticamente

diferenciadas, el sistema molibdo-nitrogenasa y otros dos de descubrimiento más reciente, vanadio-nitrogenasa y nitrogenasa-3 (Bishop, 1988).

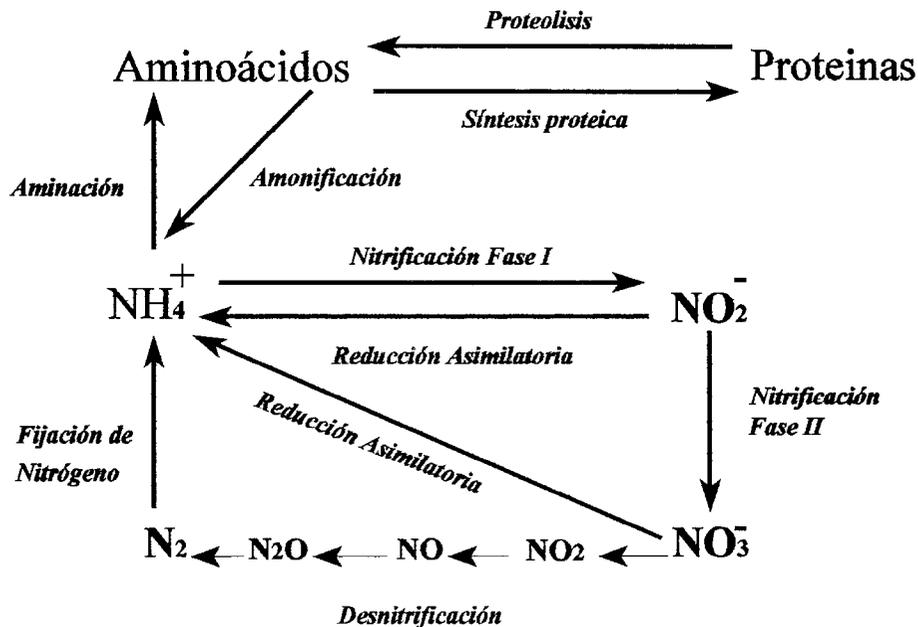


Figura 4. Ciclo del Nitrógeno

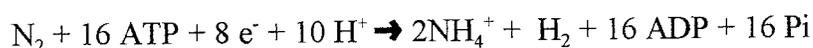
Los tres tipos de nitrogenasa conocidos constan de dos componentes. Ambos son dos metaloproteínas, la dinitrogenasa que contiene el lugar de unión del sustrato y la dinitrogenasa-reductasa o ferroproteína. La diferencia entre las tres nitrogenadas radica en la diferente naturaleza del cofactor de la dinitrogenasa ( Newton, 1993).

La dinitrogenasa o componente 1 es la subunidad proteica de mayor peso molecular . En la molibdo-nitrogenasa se denomina MoFeproteína y posee una estructura tetramérica cuyas subunidades están codificadas por genes *nif* (*nifD* y *nifK*). En la biosíntesis del centro catalítico de la enzima están involucrados varios genes *nif* (*nifQ*, *nifV*, *nifB*, *nifE*, y *nifN* ). En cuanto a las otras dos nitrogenasas, estas son independientes del Mo y se expresan en déficit de dicho metal, su dinitrogenasa es una proteína hexamérica codificada por los genes *vnfDGK* para la

vanadio-nitrogenasa y *anfD<sub>3</sub>GK* para la nitrogenasa-3.

La ferroproteína contiene una secuencia de aminoácidos muy conservada entre las nitrogenasas de diversas especies y está codificada por el gen *nifH* en el caso de la molibdonitrogenasa y *vnfH* ó *anfH* para las otras dos.

Ante un déficit de nitrógeno asimilable, se interpreta la información genética contenida en los diferentes genes *nif*, que permite la formación de las dos subunidades de la nitrogenasa. El sustrato natural del complejo enzimático es el N<sub>2</sub> que lo transformará en NH<sub>4</sub><sup>+</sup> mediante un proceso irreversible, que además libera H<sub>2</sub>.



Como se observa en la reacción, la fijación de nitrógeno es un proceso con alto consumo energético que precisa a su vez de un sistema de donación de electrones, papel asumido por la ferredoxina ( Bedmar, 1992).

Ambas subunidades son sensibles al oxígeno, por lo que los microorganismos que la contienen, desarrollan mecanismos de protección para evitar la inactividad de estos. Entre estas mecanismos de protección podemos destacar: microaerofilia, consumo intenso de oxígeno, protección conformacional de la enzima, Inhibición reversible, No inhibición de la síntesis de la enzima, formación de heterocistos o vesículas que suponen barreras al oxígeno.

Dentro de los procariotas, la capacidad de transformar N<sub>2</sub> en nitrógeno asimilable está ampliamente distribuida. Los hay anaerobios obligados o ligeramente aerotolerantes, entre los que destacan Clostridium, reductores de sulfato como Desulfatomaculum o las bacterias metanogénicas. Dentro de este grupo hay que destacar una serie de fotótrofos como Thiopedia. Un segundo grupo estaría constituido por anaerobios facultativos que solo fijan N<sub>2</sub> en condiciones de anaerobiosis y donde destacan algunas enterobacterias como Klebsiella.

El tercer grupo lo formarían aerobios y microaerófilos, que siempre fijan  $N_2$  en condiciones de microaerofilia y dentro de las cuales destacan géneros como Rhizobium que fija  $N_2$  en simbiosis y otros que lo hacen en vida libre como Azotobacter o Azomonas. dentro de este tercer grupo se deben considerar fotótrofos como las cianobacterias.

La mayor parte de las bacterias diazotrofas son capaces de fijar nitrógeno en vida libre, sin embargo algunas de ellas lo realizan estableciendo asociaciones con plantas. Estas asociaciones pueden ser de diversos tipos formando sistemas fijadores de nitrógeno de diferente capacidad, entre los que se encuentran la Rizoendosimbiosis. En este tipo de asociación la bacteria habita en unos órganos especiales o nódulos desarrollados en la raíz de una planta y en los cuales se produce la fijación. Un ejemplo de esta asociación es la producida entre bacterias del género Rhizobium y plantas leguminosas ( Elkan, 1992).

Otras asociaciones son las simbiosis asociativas, como la formada por cepas del género Anabaena con las hojas del helecho Azolla (Cervantes y Rodríguez Barrueco, 1992) ó la rizocenosis dada por cepas del género Azotobacter con las raíces de algunas gramíneas (Döbereiner, 1992).

La fijación de nitrógeno en asociación es más importante en cuanto a la cantidad de nitrógeno fijado, la cual supera en más de 10 veces al nitrógeno fijado por cianobacterias y 1000 veces al fijado por otras cepas de vida libre como Azotobacter (Stainer, *et al* 1988).

Junto a este proceso biológico de vital importancia para el mantenimiento del ciclo del N, hay que citar también la fabricación de fertilizantes nitrogenados como otra entrada de nitrógeno asimilable al medio, que hoy día supone más de 70 millones de toneladas (Martínez-Toledo, 1992). Este aporte antrópico, produce un enriquecimiento de N en el medio y por lo tanto un desequilibrio en el ciclo , causando problemas de eutrofización o contaminación.

#### 4,2.- ASIMILACION DE NITROGENO

Podemos definir la asimilación como la transformación del nitrógeno asimilable inorgánico ( $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$ ) a nitrógeno orgánico. Este proceso lo pueden realizar directamente los microorganismos fijadores de nitrógeno al emplear el  $\text{NH}_4^+$  producido, o bien los productores primarios (plantas o algas) u otros microorganismos incorporando dicho  $\text{NH}_4^+$  o  $\text{NO}_3^-$  a moléculas orgánicas.

El empleo de  $\text{NO}_3^-$  como tal supone una reducción desasimilatoria a  $\text{NO}_2^-$  y de este a  $\text{NH}_4^+$  realizado por enzimas como la nitrato y nitrito reductasa desasimilatorias, que aparecen en todas las plantas y en la gran mayoría de microorganismos. Este proceso se pone en marcha en función de las necesidades de desarrollo del organismo y no supone incrementos de  $\text{NH}_4^+$  en el medio, sino que este se asimila directamente.

Los productores primarios incorporan el  $\text{NH}_4^+$  a esqueletos orgánicos, mediante diferentes rutas metabólicas, siendo más frecuente el proceso de aminación de  $\alpha$ -ceto ácidos en el que intervienen enzimas como la glutamato deshidrogenasa. Otros procesos de asimilación de  $\text{NH}_4^+$  serían los producidos por la glutamina sintetasa y glutamato sintasa.

Con procesos como los anteriores se forman aminoácidos como el glutamato y de este por procesos de transaminación, otros aminoácidos, los cuales ya pueden aportar el nitrógeno que contienen a otras moléculas orgánicas más complejas. Al contrario que los productores primarios, los animales toman el nitrógeno orgánico formando parte de moléculas complejas, las cuales hidrolizan e incorporan a sus propias estructuras moleculares.

#### 4,3.- AMONIFICACION

Al morir un organismo, sus macromoléculas, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, son susceptibles de biodegradarse mediante transformación microbiana. En estos procesos actúan

enzimas como proteasas o exonucleasas extracelulares que transforman las macromoléculas nitrogenadas en sus monómeros.

Los microorganismos encargados de estas descomposiciones usan estas fuentes de nitrógeno orgánico como alternativa al nitrógeno inorgánico, incorporándolo a sus estructuras celulares. Solo en situaciones en las que la relación C/N de la célula bacteriana no está en torno a 10, los compuestos aminados son empleados como fuente de carbono mediante diferentes rutas metabólicas. Entre estos procesos se produce una desaminación que produce  $\text{NH}_4^+$  libre. Este proceso de amonificación se puede considerar como una mineralización al transformar el nitrógeno orgánico en nitrógeno inorgánico.

Hay que indicar que al contrario que las plantas, los animales excretan compuestos nitrogenados procedentes de su metabolismo. Así los invertebrados excretan  $\text{NH}_4^+$  directamente, las aves y reptiles ácido úrico y los mamíferos urea. Estos compuestos mediante la actividad microbiana se transforman en dióxido de carbono y amoníaco.

#### 4.4.- NITRIFICACION

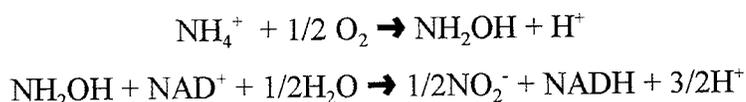
La nitrificación se puede definir como un proceso biológico mediante el cual el  $\text{NH}_4^+$  pasa a  $\text{NO}_2^-$  y a  $\text{NO}_3^-$  previa oxidación. Este proceso realizado por bacterias denominadas nitrificantes, evita la acumulación de  $\text{NH}_4^+$  en el medio, permitiendo la formación de  $\text{NO}_3^-$ , la forma más soluble.

El proceso ha sido descrito en todo tipo de suelos y aguas y es realizado fundamentalmente por bacterias aerobias estrictas, quimiolitotrofas. La nitrificación ha sido también descrita en bacterias heterótrofas como *Alcaligenes faecalis* (Papen, *et al*, 1989) ó *Thiosphaera pantotropha* (Dalsgaard, 1995). Por otro lado hay que indicar que este proceso no es exclusivo de bacterias ya que ha sido descrito en hongos como *Aspergillus* (Eylor and Schmidt, 1959) y actinomicetes (Remocle, 1977).

Dentro de las bacterias autótrofas se pueden diferenciar dos grupos:

- Nitrificantes de fase I, que son capaces de oxidar el  $\text{NH}_4^+$  hasta  $\text{NO}_2^-$ . Dentro de este grupo hay cepas pertenecientes a los géneros Nitrosomonas, Nitrosococcus, Nitrosovibrio ó Nitrosolobus.
- Nitrificantes de fase II, que son capaces de oxidar el  $\text{NO}_2^-$  hasta  $\text{NO}_3^-$ . Dentro de este grupo destacan los géneros Nitrobacter y Nitrococcus.

En la denominada fase I el  $\text{NH}_4^+$  por la acción de una monooxigenasa pasa a hidroxilamina y esta por la acción de una hidroxilamina oxidoreductasa pasa a  $\text{NO}_2^-$  (Wood, 1986).



En la fase II no hay intermedios y el  $\text{NO}_2^-$  pasa a  $\text{NO}_3^-$  gracias a la catálisis de la nitrito oxidoreductasa (Wood, 1986).



Estos procesos de nitrificación proporcionan una cierta cantidad de energía que las bacterias autótrofas precisan para fijar  $\text{CO}_2$  (única fuente de C), mediante el ciclo de Calvin. Hay que resaltar que algunas de estas bacterias cuentan con la enzima nitrito reductasa, descrita en Nitrosomonas europaea (Poth and Focht, 1985). Gracias a esta enzima y en condiciones de anoxia, son capaces de reducir el  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{N}_2\text{O}$ , evitando así el efecto tóxico de este.

Dentro de los factores limitantes para la nitrificación, el principal es el oxígeno. sin el no se puede realizar los procesos de oxidación. hay que destacar también que el proceso tiene un óptimo de temperatura en torno a los 30 °C y de pH que oscila entre 7.5 y 8.5 inhibiéndose a pH

6 (Bitton, 1994). Estos microorganismos, sobre todo Nitrosomonas son muy sensibles a tóxicos, destacando tiourea, fenol, anilina, metales pesados o cianuro.

## 5.- DESNITRIFICACIÓN

Para completar el ciclo del nitrógeno, es preciso enviar de nuevo el nitrógeno a la atmósfera, en forma de  $N_2$ . Este proceso es la desnitrificación biológica, que según Payne (1981) consiste en la reducción desasimilatoria de  $NO_3^-$  y  $NO_2^-$  a los gases  $N_2O$  y  $N_2$ .

Este proceso ha sido descrito por numerosos autores en múltiples hábitats, tales como suelos (Parkin and Robinson, 1989), aguas superficiales (Martínez-Toledo *et al*, 1996), aguas subterráneas (Dahab and Lee, 1992) o residuales (Gerritse *et al*, 1995) y es realizada por numerosas bacterias, principalmente heterótrofas, con amplia distribución taxonómica.

El  $NO_3^-$  o el  $NO_2^-$  son empleados como últimos aceptores de electrones en una cadena respiratoria en ausencia de oxígeno, el cual puede inhibir el proceso, aunque se han descrito casos de desnitrificación en aerobiosis (Patureau *et al*, 1994). Influirán también el pH y la temperatura entre otros.

Se estima que mediante la desnitrificación se pueden eliminar a la biosfera  $2 \cdot 10^8$  toneladas de nitrógeno, lo cual resalta la importancia del proceso en el mantenimiento del ciclo del nitrógeno.

### 5.1.- ANTECEDENTES HISTÓRICOS.

La desnitrificación es un proceso que se desarrolló desde los orígenes de la biosfera. Autores como Margalis y Lovelock (1974) postularon que fueron las bacterias las que generaron

mediante procesos de desnitrificación el  $N_2$  presente en la atmósfera y que hoy en día lo mantienen en constante equilibrio. A pesar de esto su conocimiento ha avanzado en la historia, al igual que otros procesos microbianos, de modo paralelo a los avances en las técnicas de análisis químico y microbiológico. Es por ello que los conocimientos actuales del desarrollo del proceso, así como su enzimología o genética se han alcanzado en los últimos 50 años.

La identificación del  $N_2$  y del  $O_2$  como compuestos que forman parte de la atmósfera, no tuvo lugar hasta las tres últimas décadas del siglo XVIII. Parece por ello difícil que con anterioridad se tuviese consciencia del fenómeno de la desnitrificación. Es más hasta la mitad del siglo XIX, los procesos de análisis químico no fueron lo suficientemente avanzados como para revelar este proceso.

Ya en 1867 y de la mano de Smith, se hace público el reconocimiento del proceso, al afirmar este, que el nitrógeno del  $NO_3^-$  desaparecía de las aguas con alto contenido en materia orgánica. Durante esta época los estudios sobre diversos elementos como suelo, agua, agua residual, fermentos, estiércol o vegetales en putrefacción se multiplicaron y con ellos las descripciones de desaparición de  $NO_3^-$  de estos elementos o la formación de  $N_2$  a partir de ellos. Todos estos casos se asociaron a la presencia de microorganismos (Reiset, 1868; Schloesing, 1868; Meusel, 1876). Schloesing (1868) llegó incluso a interrelacionar la anoxia, consumo de materia orgánica y  $NO_3^-$  con la eliminación de nitrógeno del medio.

El  $NO_3^-$  ya era conocido en la época, e incluso se conocían sus efectos beneficiosos en la agricultura. Es por ello, que el descubrimiento de los procesos de eliminación de nitrógeno del suelo, produjeron alarma entre los agricultores que no querían perder el  $NO_3^-$  de los suelos. Todo esto fue consecuencia suficiente para que los investigadores se lanzaran al estudio del fenómeno, dando importantes pasos en su conocimiento. Así Gayan y Dupetit en 1882 asignaron el término desnitrificación a la destrucción anaeróbica, productora de gas, del  $NO_3^-$  realizada en el laboratorio por microorganismos aislados del agua residual. Estos mismos investigadores comenzaron a emplear fuentes de carbono sencillas en los medios de cultivo, para aislar

desnitrificantes. En este mismo año Deherain y Maquenne (1882) confirmaban que el proceso lo realizaban microorganismos y 15 años más tarde (Deherain, 1897) se afirmó que se producía en suelos ricos en materia orgánica en los cuales se detectaba la producción de  $N_2O$ .

1886, se puede considerar un año clave en la historia de la investigación del metabolismo del N. En este año Gayan y Dupetit aislaron dos cepas desnitrificantes del agua residual. Ambos autores afirmaron que el proceso no era una fermentación y que las bacterias usaban el oxígeno del  $NO_3^-$  en las rutas metabólicas conocidas. Dentro de estos mismos estudios, reconocieron que se producía  $N_2O$  y  $N_2$  por parte de una de las cepas aisladas.

Todos estos avances creaban un mayor clima de preocupación entre los agricultores, que demandaban una solución para evitar este proceso. Con esta finalidad se empleó el descubrimiento de que el proceso estaba atenuado en hábitats ácidos (Schneidewind, 1897). Esta aplicación fue poco empleada al confirmarse el carácter ubicuo de estos microorganismos (Deherein, 1897). Varios microbiólogos de la época encontraron la solución, al afirmar que la desnitrificación la realizaban bacterias aerobias que sobrevivían de este modo al no tener acceso al aire, por lo que el aporte de aire al suelo evitaba el problema.

Podemos decir que el siglo XIX se cerró para la desnitrificación con la diferenciación que Warington (1897) hizo entre la desnitrificación y reducción de  $NO_3^-$ . Ya en las puertas del siglo XX comenzaron a cambiar los modelos de investigación, pasando de determinaciones cualitativas a las cuantitativas. Por otro lado se impuso el modelo taxonómico de Linneo y la nomenclatura binomial, por lo que se pasó a denominar a las bacterias por un género y especie tal como se hace hoy. Con este sistema de nomenclatura se le dio nombre a numerosas bacterias desnitrificantes que aún lo conservan: *Pseudomonas aeruginosa* o *Pseudomonas fluorescens*.

Las primeras cinco décadas del siglo XX pasaron sin un progreso favorable en el conocimiento de la desnitrificación. Si hay que decir que el desarrollo de otras ciencias como la bioquímica o la fisiología cambiaron algunos conceptos, destacando el hecho de que se afirmó que

la desnitrificación era un proceso respiratorio, donde el  $\text{NO}_3^-$  era reducido al emplearlo como último aceptor de electrones en una cadena respiratoria. Este nuevo concepto puesto de manifiesto por Barritt (1931) desmentía la anterior idea de que se tomase el oxígeno del  $\text{NO}_3^-$ .

Es destacable también en esta época la identificación de desnitrificantes quimiolitotrofos como Thiobacillus denitrificans (Beijerinck, 1904), capaz de fijar  $\text{CO}_2$  a expensas de la oxidación de tiosulfato ó azufre, o la de Micrococcus ( hoy Paracoccus) denitrificans capaz de crecer autotróficamente oxidando  $\text{H}_2$  (Lebedeff, 1909), aunque los procesos no se conocieron hasta mucho más tarde.

Ya en la segunda mitad del siglo XX los trabajos se centraron en el conocimiento de los intermediarios, empleando técnicas que van desde las antiguas de tipo manométrico, empleadas antes de la 2ª Guerra Mundial, hasta las modernas combinaciones de la cromatografía de gases, espectrometría de masas o de emisión, las cuales nos han permitido alcanzar los conocimientos actuales de la desnitrificación.

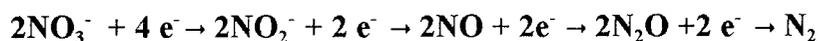
Hoy día, el proceso es sobradamente conocido a nivel genético y se han descrito numerosas especies bacterianas capaces de realizarlo en múltiples hábitats, destacando su amplia variedad taxonómica. La desnitrificación es un proceso biológico que completa el ciclo del nitrógeno por el que se vuelve a formar  $\text{N}_2$ , creciendo la inquietud por los efectos que sobre el medio puedan tener las posibles alteraciones de la flora bacteriana responsable, tales como la acumulación o pérdida de  $\text{NO}_3^-$  del medio (Martínez-Toledo *et al*, 1996)

Los procesos de contaminación generados en los últimos años, por los aportes antrópicos de nitrógeno asimilable al medio, han dado un nuevo interés por los procesos de desnitrificación a la comunidad científica, ya que en ellos parece encontrarse la solución a la acumulación de compuestos nitrogenados en las masas acuosas. Este nuevo interés nos lleva a conocer nuevas facetas de los microorganismos desnitrificantes así como los factores que descienden o potencian su actividad, con la idea de aplicarlos en la eliminación de  $\text{NO}_3^-$ . Entra de este modo la

desnitrificación biológica a formar parte de las nuevas técnicas de depuración de aguas que si bien ya tenía cierto interés en el campo de las agua residuales, surge como una alternativa de potabilización de aguas como respuesta a la contaminación de las aguas subterráneas.

## 5.2.- FASES DE LA DESNITRIFICACIÓN

La desnitrificación es un proceso complejo en el que intervienen numerosas reductasas con los consiguientes sustratos y productos finales. En definitiva el proceso es una cadena respiratoria en la que sus sustratos son aceptores de electrones procedentes, mediante otras rutas metabólicas, de fuentes de carbono en microorganismos heterótrofos o bien de oxidaciones de productos inorgánicos en autótrofos.



Cada uno de los compuestos descritos en las reacciones anteriores se pueden comportar como sustratos en la desnitrificación, dando como producto final el  $\text{N}_2$ . Para cada fase varía el equipo enzimático implicado y supone un proceso de transferencia de electrones con la consiguiente producción de energía. Hay que destacar que no todos los pasos enzimáticos se dan en todos los microorganismos desnitrificantes los cuales podrán emplearan diferentes sustratos y dar diferentes productos.

### 5.2.1.- Reducción de $\text{NO}_3^-$ a $\text{NO}_2^-$

La reducción de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  es un proceso catalizado por enzimas denominadas nitrato reductasas. Bajo este nombre , aparecen un sin fin de enzimas muy distribuidas tanto en eucariotas como en procariotas, encontrándose en plantas, hongos y muchas bacterias. Son las responsables de reducir el  $\text{NO}_3^-$  de modo asimilatorio, es decir, con la finalidad de transformarlo en  $\text{NH}_4^+$  para posteriormente incorporarlo a sus estructuras moleculares.

Al margen de estas enzimas, están las nitrato reductasas desasimilatorias, que son

exclusivas de procariotas y a las que les influye la concentración de oxígeno para su síntesis estabilidad y funcionalidad.

Atendiendo al segundo grupo de enzimas, las podemos dividir a su vez en tres subgrupos, en función de sus propiedades físicas, fisiológicas y las bacterias que las producen:

**a)** Un primer subgrupo lo forman las producidas por bacterias aerobias que pueden crecer de modo facultativo mediante fermentación o bien empleando el  $\text{NO}_3^-$  como aceptor de electrones en una cadena respiratoria. Este tipo de nitrato reductasas, que presentan un mayor tamaño molecular, aparecen en enterobacterias como Escherichia coli y no están implicadas en procesos de desnitrificación.

**b)** Un segundo subgrupo lo forman las nitrato reductasas producidas por bacterias anaerobias que obtienen energía mediante fermentación. este tipo de enzimas descritas en especies de Bacteroides ó Clostridium parecen tener como sustrato principal compuestos como el fumarato y emplean de modo ocasional el  $\text{NO}_3^-$  si está presente en el medio.

**c)** El tercer subgrupo de nitrato reductasas desasimilatorias serían las producidas por desnitrificantes. Este tipo de enzimas, son proteínas no hémicas que contienen en sus grupos prostéticos Fe y Mo. Son de menor tamaño que las anteriores y se localizan en el periplasma y membranas citoplasmáticas (Sawada *et al*, 1978).

Los dos primeros subgrupos de enzimas desasimilatorias no se inhiben por las altas concentraciones de producto ( $\text{NO}_2^-$ ), el cual a su vez puede difundir al medio o bien lo pueden transformar en  $\text{NH}_4^+$  si no tienen otra fuente de nitrógeno (Yordy and Delwiche, 1979). Así mismo algunos desnitrificantes también pueden obtener  $\text{NH}_4^+$  mediante una ruta asimilatoria, tal es el caso de Pseudomonas aeruginosa que tiene nitrato reductasas asimilatorias y desasimilatorias. Ambas enzimas tienen el mismo sustrato y dan el mismo producto, pero se regulan de diferente forma (Pichinoty *et al*, 1969).

La presencia o no de la nitrato reductasa desasimilatoria, no es determinativa de la capacidad desnitrificante de una cepa. Hay casos descritos de desnitrificantes que no la sintetizan, pero si emplean el  $\text{NO}_2^-$  como aceptor de electrones en la cadena respiratoria, tal es el caso de Alcaligenes odorans que solo desnitrifica en presencia de  $\text{NO}_2^-$  (Payne, 1973). Otro caso descrito es el de Alcaligenes eutrophus que si es capaz de reducir el  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$ , pero empleando una nitrato reductasa asimilatoria. el  $\text{NO}_2^-$  obtenido tras la acción de esta encima puede seguir dos rutas metabólicas diferentes, la asimilatoria o la desnitrificante. en el caso de estas cepas la ruta asimilatoria se paraliza por las concentraciones de  $\text{NH}_4^+$ .

### 5,2,2.- Reducción de $\text{NO}_2^-$ a NO

Se han lanzado muchas hipótesis hasta llegar a la conclusión de que el NO es un intermediario de la desnitrificación. Ya en 1910 se sugirió como tal, pero no se aceptó hasta 1973 cuando Payne lo confirmó, tras recopilar múltiples investigaciones. Para llegar a esta conclusión, en contra de que el  $\text{N}_2\text{O}$  era producido desde el  $\text{NO}_2^-$  por una misma enzima, se precisó aislar e identificar las enzimas implicadas en el proceso, así como el gen del que son originarias. Hoy en día se sabe que es el gen "nir" el que contiene la información genética responsable de este paso tan específico de desnitrificantes, por lo que la presencia de dicho gen en una cepa bacteriana puede ser determinativo de su capacidad como desnitrificante.

Actualmente se conocen dos nitrito reductasas desasimilatorias, cuyo sustrato es el  $\text{NO}_2^-$  y el producto el NO. Hay que indicar que también producen aunque en muy bajo nivel  $\text{N}_2\text{O}$  (Weeg-Aerssens *et al*, 1991). Estas dos enzimas son:

- Citocromo  $\text{cd}_1$ : Es un tetrámero que presenta dos grupos hemo (Coyne *et al*, 1989).
- Cu-Nitrito reductasa: Un trímero con dos átomos de cobre en cada monómero ( Ye *et al*, 1993).

Ambas enzimas son típicas de desnitrificantes, se suelen situar en el periplasma celular de cepas gram negativas, encontrándose también ligadas a la membrana citoplasmática de gram positivas como Bacillus halodenitrificans (Zumft, 1993).

Al igual que en caso anterior, hay que citar la existencia de otras enzimas reductoras de  $\text{NO}_2^-$ , que en este caso toman como sustrato el  $\text{NO}_2^-$  transformándolo en  $\text{NH}_4^+$  vía asimilatoria. Estas enzimas aparecen en plantas, hongos y en la mayoría de las bacterias, pero no están relacionadas con la desnitrificación (Payne, 1981).

El NO difunde fuera de la célula bacteriana en casi un 70% de total producido (Zafirau *et al*, 1989). Es muy reactivo y muy tóxico para la célula al reaccionar con grupos hemo o proteínas de Cu o Fe, dando complejos metal-nitrosil (Henry *et al*, 1991). Es por ello preciso para la célula eliminar rápidamente el NO, realizándolo gracias a la alta velocidad de acción de la óxido-nítrico reductasa.

La activación de la nitrito reductasa, se hace previa estimulación de la información genética contenida en el gen "*nir*", la cual se realiza en presencia de sustrato y en anaerobiosis (Arai *et al*, 1991). El proceso de inhibición realizado por el oxígeno para la interpretación de la información genética no es muy conocido en desnitrificantes. Se piensa que puede ser semejante al descrito por Spiro y Guest (1990) para Escherichia coli, en el que interviene una proteína (*fnr*) como activadora ó no de la información genética.

### **5,2,3.- Reducción de NO a N<sub>2</sub>O**

Junto al gen "*nir*", en el mismo grupo genético, se encuentra el gen que porta la información para la síntesis de la óxido nítrico reductasa. Este gen se denomina "*nor*".

Hasta hoy se han aislado dos tipos de óxido nítrico reductasas, enzimas exclusivas de desnitrificantes. Ambas se encuentran en la membrana citoplasmática y son citocromos complejos

que contienen grupos hémicos así como Fe no hémico (Ye *et al*, 1994). La actividad de estas enzimas tiene una doble función. Por un lado, es detoxificante al reducir rápidamente el NO a N<sub>2</sub>O evitando así su efecto tóxico en la célula, lo cual se realiza gracias a una baja Km y a una V<sub>max</sub> mucho más alta que la de las nitrito reductasas (Remde and Conrad, 1991). Por otro lado el NO se comporta como aceptor de electrones, al igual que el resto de los componentes de la cadena respiratoria que supone la desnitrificación. Esto provoca un gradiente de H<sup>+</sup> conservando así la energía (Shapleigh and Payne, 1985).

El mecanismo de las óxido nítrico reductasas no es del todo conocido, aunque se sabe que estequiométricamente se deben reducir dos moléculas de NO para dar una de N<sub>2</sub>O, proceso en el cual pueden intervenir los Fe no hémicos que porta la enzima, al igual que los hémicos (Ye *et al*, 1994).

La reducción de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, al igual que la de N<sub>2</sub>O son procesos independientes dentro de la desnitrificación, sin embargo no sucede lo mismo con la reducción de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y NO. Ambos procesos están interrelacionados tanto a nivel genético como funcional. De este modo la reducción de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> hasta N<sub>2</sub>O parece realizarse por solo una unidad funcional.

La expresión de estas enzimas parece influirse por el oxígeno (Korner, 1993). Parte de este control anaeróbico se ejerce a nivel genético. Justo antes de los genes "*nir*" y "*nos*" aparece un homólogo a la proteína *fnr* de Escherichia coli, obtenida de desnitrificantes como Pseudomonas aeruginosa o Ps stutzeri (Ye *et al*, 1993). Esta proteína sensible al potencial rédox es activadora de la transcripción, regulando la interpretación genética de los genes "*nir*" y "*nos*" en función de la concentración de oxígeno (Zumft, 1993). Por otro lado hay evidencias de una unión a nivel proteína-proteína que acepta electrones del citocromo c, reduciendo así conjuntamente al NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a NO y este a N<sub>2</sub>O. Los efectos sobre la nitrito reductasa no solo afectarán a la reducción del NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, sino también a la reducción del NO y viceversa.

#### 5,2,4.- Reducción de N<sub>2</sub>O a N<sub>2</sub>

La reducción de N<sub>2</sub>O a N<sub>2</sub> es el último paso de la desnitrificación. En este paso, al igual que en los anteriores, el N<sub>2</sub>O actúa como aceptor de electrones, cedido en este caso a través de un citocromo b en *Ps denitrificans* ( Matsubara, 1975), creando un gradiente de H<sup>+</sup> con la consiguiente conservación de energía.

La información genética de este proceso aparece en el denominado gen "nos" a partir de la cual se forma una apo-proteína inactiva, que tras situarse en el periplasma celular e incorporar como cromóforo al Cu, es capaz de catalizar el proceso (Körner and mayer, 1992).

La síntesis de esta enzima se ve inducida por la presencia de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ó N<sub>2</sub>O y no se inhibe, como sucede con otras enzimas por la presencia de oxígeno (Korner and Zumft, 1989). Coyne y Tiedje (1990) observaron que para *Achromobacter cycloclastes* la enzima se produce en presencia de altas concentraciones de oxígeno, aunque su actividad solo era detectable cuando la concentración de oxígeno descendía de 23 μM.

Knowles (1982) indicó que la actividad de esta enzima se podía afectar por el valor del pH, la presencia de oxígeno y de sulfuros. Junto a esto hay que destacar el bloqueo que sobre la enzima realiza el acetileno, efecto que ha sido aprovechado en múltiples investigaciones sobre la desnitrificación (Sorensen, 1978; Yoshinari and Knowles, 1976; Lohse *et al*, 1996; Bengtsson and Bergwall, 1995). Otro efecto inhibitor lo realizan sustancias como cianuro, azida, dinitrofenol (Payne, 1981) o los metales pesados e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Richards and Knowles, 1995). Todos estos efectos sitúan a la enzima como una de las mas lábiles del proceso. Todos estos bloqueos e inhibiciones de la óxido nitroso reductasa, son causa de un elevado aporte de N<sub>2</sub>O, sin embargo y debido a que la enzima sigue un modelo cinético de Michaelis Menten, siempre se acumula en pequeñas concentraciones en los procesos de desnitrificación (Betlach and Tiedje, 1981).

### 5.3.- LOS DESNITRIFICANTES

Atendiendo a la definición de Payne (1981), la desnitrificación es un proceso exclusivo de procariotas. Dentro de estos son pocos los microorganismos capaces de respirar empleando óxidos de nitrógeno como último aceptor de electrones, sin embargo están ampliamente distribuidos a nivel taxonómico.

Como es lógico pensar, los hábitats típicos de desnitrificantes serían ambientes anaeróbicos ricos en  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  y ciertamente en estos hábitats se encuentran en mayor número, como puede ser el caso de la rizosfera de suelos fuertemente fertilizados, las aguas residuales o los sedimentos de masas acuosas (Tiedje, 1978). Sin embargo, la mayoría de los desnitrificantes poseen mecanismos alternativos para producir ATP, tales como la respiración anaeróbica, fotosíntesis ó fermentación. Estas propiedades hacen de los desnitrificantes unos microorganismos ubicuos, aislados en innumerables hábitats, tales como suelos (Pozo et al, 1995), incluidos los árticos y los antárticos (Delaporte, 1972) en sedimentos de ríos y lagos (Rysguard et al, 1993), en aguas superficiales (Martínez-Toledo et al, 1996) y subterráneas (Bengtsson and Bergwall, 1995), en hábitats marinos (Lohse et al, 1996) o bien en aguas residuales (Oostrom and Russell, 1994).

Actualmente son más de 70 géneros los que cuentan con especies capaces de desnitrificar (Anon, 1984). De entre ellos el género Pseudomonas es el que cuenta con un mayor número de especies, aisladas mayoritariamente de aguas o suelos, aunque hay especies como Pseudomonas aeruginosa, Ps. fluorescens, Ps. Stutzeri o Ps. pickettii, que se aíslan también de muestras clínicas de humanos (Palleroni et al, 1970). Este género lo forman bacilos aeróbicos gram negativos heterótrofos, sin embargo dentro de el hay cepas quimiolitotrofas facultativas como Ps. pseudoflava. Es frecuente también aislar Pseudomonas desnitrificantes de plantas como Ps. caryophylli o Ps. solanacearum. Otros bacilos aerobios gram negativos aislados como desnitrificantes pertenecen a los géneros Agrobacterium, Gluconobacter, Alcaligenes o Rhizobium, donde destaca Rhizobium japonicum, una especie fijadora de nitrógeno que es capaz

de desnitrificar en presencia de  $\text{NO}_3^-$  y ausencia de  $\text{O}_2$  (Zalolowicz and Focht, 1979).

Una característica destacable de los desnitrificantes es su gran variedad morfológica, ya que no solo hay descritos desnitrificantes entre los bacilos aerobios gram negativos, también aparecen géneros como Neisseria, aisladas de muestra humanas o animales, los cuales la mayoría no cuentan con la nitrato reductasa desasimilatoria y desnitrifican desde el  $\text{NO}_2^-$ . Junto a este género perteneciente a los cocos gram negativos, aparecen otros como Kingella o Paracoccus, destacando especies como P. denitrificans o el halófilo P. halodenitrificans.

Junto a la variedad morfológica, se une la gran variedad fisiológica, existiendo desnitrificantes entre los anaerobios facultativos como Chromobacterium y Flavobacterium, entre las bacterias del azufre como Thiobacillus denitrificans, entre los termófilos como Thermothrix thioporus, o entre las bacterias fototróficas como Rhodopseudomonas sphaeroides, capaces de realizar fotosíntesis anoxigénica. Otros grupos fisiológicos dentro de los cuales se incluyen desnitrificantes son las bacterias deslizantes como Cytophaga johnsonae, las bacterias con apéndices como Hyphomicrobium o las bacterias espirales o curvadas, donde destacan especies como Aquaspirillum itersonii, Spirillum lipoferum ó Campylobacter sputorum.

Dejando atrás las bacterias gram negativas, dentro de las gram positivas también encontramos numerosas especies, aunque en menor cantidad y con menor variedad fisiológica que las anteriores. Dentro de este grupo destaca el género Bacillus formado por bacilos aerobios gram positivos formadores de esporas. Especies desnitrificantes de este género como B. polymyxa, B. stearothermophilus o B. azotoformans son aislados principalmente de suelos, aunque destacan algunos aislados de larvas de abejas como B. pulvificiens. Otros bacilos gram positivos desnitrificantes son los no formadores de esporas como Corynebacterium nephridii y Propionibacterium acidi-propionici.

La capacidad desnitrificante sin embargo está ausente en otros grupos bacterianos como las Enterobacterias. Estos microorganismos poseen enzimas como la nitrato reductasa

asimilatoria, por lo que solo son capaces de reducir  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  para posteriormente reducirlo a  $\text{NH}_4^+$ . La ausencia del Citocromo c (Oxidasa negativos), principal donador de electrones a la cadena respiratoria de la desnitrificación, parece reflejar la incapacidad para desnitrificar, sin embargo se han descrito cepas como Serratia marcescens como posibles desnitrificantes al igual que otras oxidasa negativas como Bacillus licheniformis (Lemille et al, 1969) o cepas de Acinetobacter (Focht and Joseph, 1974).

Otros grupos bacterianos donde no se describen desnitrificantes son las bacterias anaerobias gram negativas, las metanogénicas, los cocos gram positivos, las corynebacterias, actinomicetales o Rickettsias.

#### **5.4.- FACTORES QUE AFECTAN A LA DESNITRIFICACION**

Según Payne (1981) un sistema de desnitrificación tiene cuatro componentes básicos:

- a) Un donador de electrones.
- b) Un aceptor de electrones, que será un óxido de nitrógeno.
- c) Una baja tensión de oxígeno.
- d) Un microorganismo desnitrificante.

La conjugación de estos cuatro elementos, lógicamente da lugar a un descenso en la concentración del óxido de nitrógeno y a una emisión de gases, fundamentalmente  $\text{N}_2$ .

Hay otros factores como el pH, la temperatura o la presencia de otros compuestos en el medio, que pueden afectar en mayor o en menor grado al proceso. Autores como Nammik (1956) observaron que bajo el 60% de humedad relativa no se apreciaba la desnitrificación de suelos. Hay por lo tanto que tener también en cuenta la influencia que tiene el grado de saturación de agua en la desnitrificación de suelos.

#### **5,4,1.- Necesidad de un donador de electrones.**

Podemos entender la desnitrificación como un proceso alternativo, mediante el cual se obtiene energía gracias a una reducción de óxidos de nitrógeno. Para que esta reducción se produzca, se precisa de una oxidación previa de otros compuestos, produciéndose con ella una donación de electrones.

Dentro de la gran variedad fisiológica que caracteriza a los desnitrificantes, el grupo más abundante son los heterótrofos. Este conjunto de microorganismos son capaces de emplear una amplia gama de fuentes de carbono que pueden ir desde la materia orgánica que se encuentra en el estiércol (Petersen et al, 1996), o en el agua residual (Hallin et al, 1996), hasta emplear xenobióticos como la anilina (Alexandra et al, 1994) o alquilbencenos (Hutchins, 1993). Sin embargo, a pesar de poder emplear cualquiera de estas fuentes de carbono, las preferidas por los microorganismos desnitrificantes son moléculas más fácilmente metabolizables como carbohidratos, alcaloides o ácidos orgánicos (Akunna et al, 1993; Nurizzo and Mezzanotte, 1992; Dahab and Lee, 1992; Sison et al, 1996).

La presencia de estas fuentes de carbono es fundamental para que tenga lugar la desnitrificación por heterótrofos. Algunos autores incluso estudian la magnitud con la que se da la desnitrificación, para tener idea de la cantidad de fuente de carbono disponible que hay (Christensen, 1992). Sin embargo otros factores como el tipo de fuente de carbono o la concentración de esta influirán en la mayor o menor eliminación desasimilatoria de  $\text{NO}_3^-$ . Clay et al (1996) describían variaciones estacionales en la desnitrificación producida en acuíferos poco profundos. Esta variación se debía fundamentalmente a la diferente biodisponibilidad de materia orgánica según la estación del año. Casos semejantes se han descrito en suelos al encontrar una influencia de la profundidad del suelo en la mayor o menor capacidad de eliminar  $\text{NO}_3^-$ . Esta influencia es debida principalmente a la diferente concentración de materia orgánica que hay según la profundidad del suelo (Willens et al, 1997).

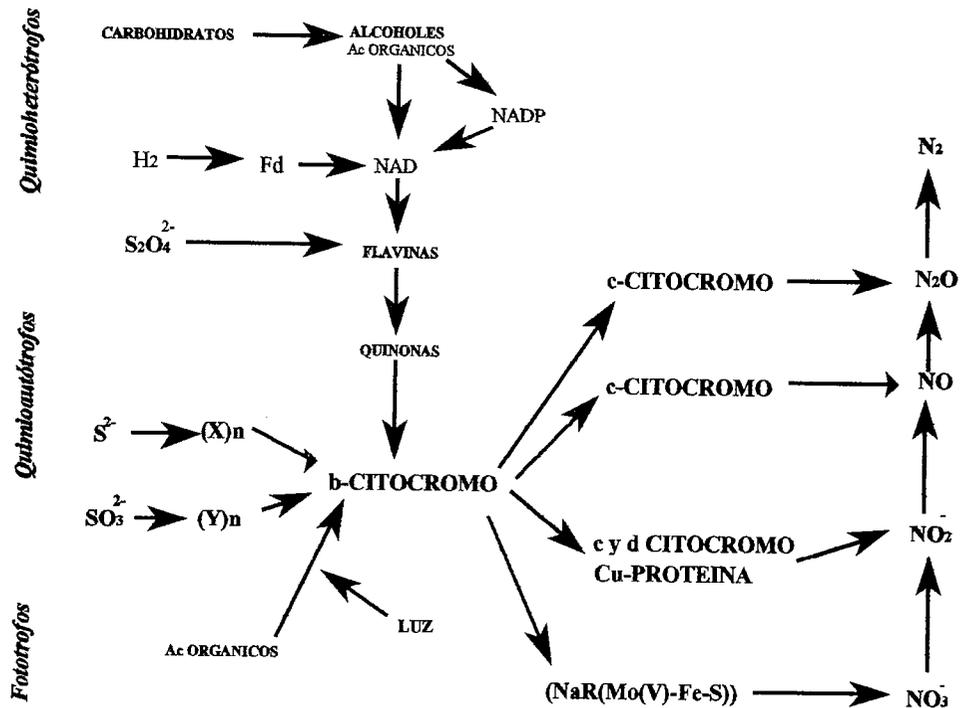


Figura 5. Diagrama del transporte de electrones en la desnitrificación.

En cuanto al tipo de fuente de carbono, Constantín y Fick (1997) destacaron una mayor actividad desnitrificante al emplear ácido acético en lugar de etanol. Esto se debe a un empleo directo del ácido acético por la bacteria, sin necesidad de otras transformaciones metabólicas que si se precisarían al emplear otras fuentes de carbono, suponiendo un gasto energético al microorganismo. Por otro lado hay que destacar que no todos los microorganismos desnitrificantes son capaces de emplear las mismas fuentes de carbono, así *Thiosphaera pantotropha* es incapaz de desnitrificar en presencia de metanol (Egert et al, 1993), tal y como lo hace *Hyphomicrobium* (Nyberg et al, 1992).

Dentro del grupo de los heterótrofos hay microorganismos que en ausencia de fuente de

carbono orgánica pueden comportarse como quimioautótrofos, usando el CO<sub>2</sub> como fuente de carbono, a partir del cual sintetizan las estructuras moleculares. Este CO<sub>2</sub> no se comporta como un donador de electrones por lo que emplean el H<sub>2</sub> como tal. Algunos heterótrofos que pueden realizar esta desnitrificación quimioautótrofa son Paracoccus denitrificans o Alcaligenes eutrophus.

Como vemos, no solo las fuentes de carbono orgánico se pueden comportar como donadores de electrones. Otros compuestos químicos como los derivados de azufre tiosulfato, sulfuros o sulfitos, pueden oxidarse por microorganismos, cediendo así sus electrones a la cadena respiratoria de la desnitrificación. Este proceso es realizado por algunos quimioautótrofos con capacidad desnitrificante como Thiobacillus denitrificans o Thiomicrospira denitrificans.

Otra posible fuente de electrones para la cadena respiratoria desnitrificante es la realizada por fotótrofos como Rhodospseudomonas sphaeroides. En este microorganismo la luz produce una excitación de moléculas de agua con la consiguiente cesión de electrones.

#### **5,4,2.- Influencia del oxígeno**

La afirmación que Payne (1981) daba sobre el efecto negativo que el oxígeno tenía sobre la desnitrificación, ha sido corroborada por muchos autores. Thauer et al (1977) afirmaban que teóricamente la desnitrificación producía menos energía que el empleo de oxígeno como último aceptor de electrones, si a esto le unimos que otros autores afirmaban que el oxígeno inhibía la síntesis de algunas enzimas implicadas en la desnitrificación (John, 1977; Tiedje, 1982), se puede pensar que este proceso solo se da en anaerobiosis. Esta influencia negativa del oxígeno se ha observado en procesos de eliminación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> mediante desnitrificación realizados para aguas residuales o subterráneas (Hagedorn-Olsen et al, 1993 ).

Este efecto negativo del oxígeno, no afecta por igual a todas las bacterias desnitrificantes. Thiosphaera pantotropha, Alcaligenes faecalis, Pseudomonas nautica ó Camomonas se han

descrito como microorganismos que son capaces de desnitrificar en presencia de oxígeno (Robertson et al 1988; Bonin and Gilewick, 1991; Patureau et al, 1994). En estos casos, tanto el oxígeno como el  $\text{NO}_3^-$  se emplean como aceptores de electrones, disponiendo la bacteria de los dos mecanismos enzimáticos. Como es lógico la capacidad de eliminación del  $\text{NO}_3^-$  desciende de modo proporcional a la concentración de oxígeno presente.

Como se aprecia para los microorganismos anteriores, el proceso no es totalmente anaeróbico. Otros microorganismos como Paracoccus denitrificans tampoco cesan su actividad desnitrificante en presencia de oxígeno, pero si se observan cambios en su actividad que indican que el oxígeno presenta una influencia a nivel enzimático. Danies et al (1989) observaron como en presencia de oxígeno descendía la cantidad de  $\text{N}_2$  producido en la desnitrificación realizada por P. denitrificans, sin embargo aumentaba el  $\text{N}_2\text{O}$  y se precisaban concentraciones muy altas de oxígeno para que desapareciera por completo la producción de  $\text{N}_2$ . Estos datos sugieren que para este microorganismo la óxido nitroso reductasa es una enzima sensible al oxígeno. Esta enzima se inactiva en presencia de oxígeno, inhibiéndose así el último paso de la desnitrificación. Un caso semejante fue descrito por Thomas et al (1994) para cepas de Pseudomonas aeruginosa las cuales en presencia de oxígeno aumentaban la relación  $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$  producidos.

Al contrario de lo que sucede con las cepas anteriores, para Pseudomonas fluorescens Thomas et al (1994) observaron que era incapaz de desnitrificar en anaerobiosis, una vez crecida en un ambiente aeróbico. Algo parecido describieron Korner y Zumft (1989) al observar que cepas de Pseudomonas stutzeri eran incapaces de producir la nitrito y la óxido nitroso reductasa si la concentraciones de oxígeno en el medio superaban los 5 mg/l. Surge aquí una sospecha de una influencia del oxígeno a nivel genético.

Braun y Zumft (1992) observaron que la información genética que codifica las enzimas nitrito reductasa y óxido nitroso reductasa se sitúa en Pseudomonas stutzeri de modo contiguo en el mismo grupo genético. esto implica que presentan una regulación conjunta. Más tarde Cuypers y Zumft (1993) aislaron, previo a los genes de estas dos enzimas, un homólogo de la

proteína *fnr*, un activador de la transcripción sensible al potencial redox. Todo esto implica que para esta cepa hay una regulación de la síntesis de las enzimas de la desnitrificación a nivel genético y que puede ser influenciada por la concentración de oxígeno en el medio.

Otra enzima que se afecta por las concentraciones del oxígeno es la nitrato reductasa desasimilatoria. Sin embargo al igual que para otras enzimas esta influencia dependerá de la cepa bacteriana. Coyne y Tiedje (1990) afirmaban que la nitrato reductasa desasimilatoria de *Achromobacter cycloclastes* se sintetizaba en mayor o menor concentración dependiendo de la concentración de oxígeno, al igual que sucede con *Pseudomonas stutzeri* que para valores superiores a 5 mg/l de oxígeno disuelto no se detecta la enzima (Korner and Zumft, 1989). Por otro lado Costignetti y Hallocher (1982) afirmaban que *Alcaligenes* sp. sintetizaban esta enzima en aerobiosis.

Atendiendo a lo descrito anteriormente, el oxígeno puede afectar a la desnitrificación de tres modos diferentes, dependiendo a su vez de la cepa bacteriana.

- Efecto competitivo. Desciende la reducción desasimilatoria de óxidos de nitrógeno, al aportar más energía a la bacteria el empleo del oxígeno como último aceptor de electrones.
- Efecto inhibitorio a nivel enzimático, descendiendo la actividad de ciertas enzimas en función de la concentración en el medio.
- Efecto inhibitorio a nivel genético al no permitir la síntesis de ciertas enzimas en función de su concentración.

Estos efectos no se detectan por igual en todos los microorganismos desnitrificantes, destacando unos más que otros en función de la cepa bacteriana.

### **5,4,3.-Presencia de óxidos de nitrógeno**

Lógicamente para que la desnitrificación tenga lugar, es preciso la presencia de óxidos de nitrógeno que actúen como aceptores de electrones. Estos óxidos de nitrógeno son a su vez los responsables de la síntesis de las enzimas desnitrificantes.

Körner y Zumft (1989) observaron que cepas de Pseudomonas stutzeri eran incapaces de sintetizar enzimas desnitrificantes en anaerobiosis si en el medio no aparecen óxidos de nitrógeno. Así la presencia de un óxido de nitrógeno determinado, potencia la síntesis de su propia reductasa, por lo que el  $N_2O$  favorece la síntesis de la óxido nitroso reductasa y el  $NO_2^-$  de la nitrito reductasa.

La presencia de  $NO_3^-$ , en el caso de Ps. stutzeri, supone una activación de todas las enzimas que intervienen en la desnitrificación y su ausencia supone la no síntesis de reductasas (Xu and Eufors, 1996). Este fenómeno fue también observado por Coyne y Tiedje (1990) en Achromobacter cycloclastes con la variación de que el  $NO_3^-$  solo activa la nitrato y nitrito reductasa, mientras que la óxido nitroso reductasa se activa por el  $NO_2^-$  y el  $N_2O$ . Como en otras regulaciones el proceso no es igual en todos los casos y dependerá de la cepa concreta.

A parte de esta activación enzimática producida por la presencia de los óxidos de nitrógeno, hay que destacar un efecto inhibitorio que el nitrato produce en el proceso. Este anión a grandes concentraciones inactiva la nitrito reductasa por lo que se produce una acumulación de  $NO_2^-$  en el caso de Ps. stutzeri que puede llegar a ser tóxico para la bacteria (Körner y Zumft, 1989). Hay por ello que tener en cuenta que elevadas concentraciones de  $NO_3^-$  pueden inactivar el proceso y provocar acumulación de  $NO_2^-$  realizado por determinados microorganismos. Este fenómeno no ha sido descrito a nivel medio ambiental, donde autores como Pfenning y McMahan (1996) destacaron que la concentración de  $NO_3^-$  afectaba a la desnitrificación.

#### 5,4,4.- Influencia del pH

La influencia del pH sobre la desnitrificación se ha estudiado por numerosos investigadores en diferentes hábitats, que van desde el estudio de la desnitrificación en suelos (Davidson and Swank, 1986) hasta en sistemas de tratamiento de aguas residuales (Oenema y Vethaf, 1993). En todos los casos se coincide que el pH óptimo para la desnitrificación está próximo a la neutralidad, aunque el valor óptimo varía con la especie (Thomas et al, 1994).

Tanto un incremento como un descenso del pH provocan un descenso en la actividad desnitrificante, llegando a pasar de un 100% de actividad a pH 7-8 hasta un 30% a pH inferiores a 6.0 ó superiores a 9.0 (Beaubien et al, 1995). De todos modos se ha observado actividad desnitrificante a pH 3.7 (Parkin et al, 1985) y pH 11.0 (Prakasan and Loehr, 1972).

El efecto del pH parece residir en su actividad frente a las enzimas responsables de la desnitrificación. Autores como Koskinen y Keeney (1982) observaron que en suelos ácidos, el principal compuesto obtenido es el  $N_2O$ . Algo parecido describían Thorn y Sørensen (1996) al observar que el pH ácido era el responsable de la producción de  $N_2O$  en aguas residuales. Ante esto, parece que la óxido nitroso reductasa no solo es sensible al oxígeno, sino también al pH. Según Thomsen et al (1994) el efecto del pH repercute en la  $V_{max}$  de la enzima. Por lo general a pH neutro la  $V_{max}$  de las reductasas implicadas en la desnitrificación es mayor cuanto más reducido es su sustrato. Debido a esto no se aprecian intermediarios en la desnitrificación. Sin embargo al descender el pH desciende la  $V_{max}$  y por lo tanto se aprecian los intermediarios.

A parte de este efecto a nivel enzimático, hay que destacar otro a nivel de crecimiento poblacional. Nägele y Conrad (1990) observaron que las concentraciones de NO y  $N_2O$  se incrementaban a pH ácido, produciéndose un descenso en la actividad desnitrificante. Sin embargo al aumentar el pH hacia la neutralidad se descendían las concentraciones de NO y  $N_2O$ , aumentaba la actividad desnitrificante y se registraba un espectacular incremento de la población desnitrificante, incrementándose por ello la actividad.

### 5,4,5.- Influencia de la temperatura

La desnitrificación se puede considerar como un proceso biológico dependiente de la temperatura. Payne (1981) afirmaba incluso que en aguas residuales el proceso se podría expresar por la ecuación de Arrhenius, al depender exponencialmente de la temperatura.

Hay un valor mínimo de temperatura, bajo el cual no se produce una reducción desasimilatoria de óxidos de nitrógeno. En el caso de las aguas residuales el mínimo se estima en valores inferiores a 5°C (Bitton, 1994) y en suelos se puede apreciar una actividad mínima a 2°C (Payne, 1981). A estas temperaturas solo se detectan valores ínfimos de N<sub>2</sub>O, los cuales se incrementan al aumentar la temperatura. Según las investigaciones de Nommik (1956) hasta valores entre 12 a 13°C no se detecta producción de N<sub>2</sub> en suelos. Esta misma temperatura ha sido indicada como el inicio de la reducción desasimilatoria de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en Camomonas testosteroni (Bernet et al, 1995).

Atendiendo a estas variaciones de la desnitrificación con la temperatura, se puede pensar en una variación estacional del proceso. Estas variaciones estacionales se detectan desde zonas húmedas (Pavel et al, 1996), suelos (Willems et al, 1997), aguas residuales (Dawson and Murphy, 1972) ó sedimentos de rios (Pfenning and McMahan, 1996), donde se observó un aumento del 77% en la desnitrificación al pasar de 4°C a 22°C.

Como toda actividad bacteriana, la desnitrificación también tiene unos valores de temperatura máximos. El valor máximo al cual se ha detectado la actividad desnitrificante es 75°C, inhibiéndose el proceso a temperaturas superiores (Nommik, 1956). Bremner y Show (1958) indicaron que los valores óptimos de la temperatura para la desnitrificación eran 60 a 65°C. Estos valores se consideraron como muy elevados para un proceso biológico por Mc Kenney (1979), aceptando como máximo 50°C. Mc Kenney et al (1984) afirmaban que a estas temperaturas podría predominar una reducción química detectada en diferentes tipos de suelos a temperaturas incluso de 80°C.

A pesar de que las temperaturas consideradas como óptimas anteriormente realmente pueden ser muy altas para un proceso biológico, hay que destacar que entre los desnitrificantes hay descritos algunos termófilos como *Pyrobaculum aerophilum* (Volkl et al, 1993), capaces de desarrollarse a temperaturas de 110°C y por lo tanto de desnitrificar.

Hay que destacar que la temperatura también afecta a la relación  $N_2O/N_2$  descendiendo al aumentar la temperatura. Es por ello posible una influencia enzimática que no afecta por igual a todos los pasos del proceso.

#### **5,4,6.- Otros efectos sobre la desnitrificación**

Aparte de la influencia que sobre la desnitrificación presentan los factores anteriormente descritos, hay que tener en cuenta que sustancias que pueden aparecer en hábitats normales de desnitrificantes, pueden influir en la actividad. Estas sustancias pueden ser xenobióticos como pesticidas, frecuentes en suelos agrícolas o productos industriales como polifenoles.

El efecto que esta amplia gama de sustancias puede tener sobre la desnitrificación es muy variable. Puede suceder como en el caso del clorpirifos, un insecticida que no afecta al normal desarrollo de la comunidad desnitrificante (Pozo et al, 1995) o bien emplearse como fuente de carbono que proporciona electrones que posteriormente se cederán a la cadena desnitrificante (Focht and Joseph, 1974; Arcángeli and Arvi, 1993).

Otras sustancias que pueden influir en la actividad son los metales pesados. Estas sustancias pueden influir negativamente sobre los microorganismos desnitrificantes. Este efecto negativo ha sido empleado por autores como Gumaelius et al (1996), el cual se basa en la viabilidad de cepas desnitrificantes como ensayo de toxicidad para los metales pesados.

A parte de la influencia de estas sustancias, hay que indicar que estos microorganismos precisan de ciertos factores de crecimiento que van desde grupos prostéticos de algunas enzimas

como Fe, Mo o Cu, hasta vitaminas como la tiamina o cobalamina cuya ausencia en medios de cultivo es la causa de posibles acumulaciones de  $\text{NO}_2^-$  o de que no haya actividad desnitrificante (Blaszczyn, 1993).

## 6.- TRATAMIENTOS DE AGUAS

Los Hititas y los Romanos fueron las primeras civilizaciones de las que se tiene constancia que empleasen sistemas de tratamiento integral del agua. Estos tratamientos se perdieron en la edad media, donde los sistemas de agua urbanos solo incluían el abastecimiento de agua, eliminándose las aguas residuales de forma individual e incontrolada. Ya en el siglo XIX se comenzó a tener clara la conexión entre higiene, patógenos y enfermedades, estableciéndose firmemente la necesidad de controlar las aguas residuales (Aspegren *et al*, 1997) por sus posibles efectos de contaminación sobre los recursos de agua.

Ciertamente el agua es un vehículo de elementos, algunos de los cuales pueden causar enfermedades. Estos elementos pueden tener diversos orígenes, siendo los más problemáticos los de origen fecal, cuyo principal foco de transmisión son las aguas residuales. El uso incontrolado de estas aguas contaminadas ha llegado a ser causa de grandes epidemias, que aun en nuestros días se siguen produciendo, tal es el caso de las grandes epidemias de colera sufridas por países como Zaire o Marruecos.

El fuerte desarrollo demográfico y económico, traen consigo un aumento de las necesidades de agua, indispensables para mantenerlo. En la Carta Europea del Agua (Anon, 1992), quedó reflejada esta importancia del agua, considerándolo como un bien preciado indispensable para la vida.

Este incremento del uso del agua tiene como consecuencia una alteración en su calidad. Realmente y con raras excepciones, el agua tal como se encuentra en el medio, no se presenta en condiciones óptimas para su empleo en abastecimiento. Las condiciones de potabilidad, que suelen

estar marcadas por las autoridades (B.O.E. 1138/1990), tratan de regular estas condiciones óptimas, evitando la presencia de elementos que puedan causar problemas de tipo socio-económicos o de salud pública.

Los principales problemas planteados por el consumo de agua han sido las enfermedades de transmisión feco hídrica. Es por ello que uno de los tratamientos imprescindibles, previos al abastecimiento, es la desinfección. Este proceso que consiste fundamentalmente en la eliminación de patógenos del agua, se realiza por procesos de oxidación-reducción, empleando para ello potentes oxidantes como el cloro o el ozono (Purschel, 1976).

Los patógenos no son el único elemento indeseable del agua que hay que tratar. Hay otra serie de parámetros como son los de carácter organoléptico, fisico-químicos o las denominadas sustancias indeseables (B.O.E. 1138/1990), que precisan de otros tratamientos adicionales para adecuarlos a las cantidades consideradas como óptimas para su uso en abastecimiento. Todo esto da lugar a las denominadas Estaciones Depuradoras de Aguas Potables (ETAP), encargadas de la adecuación del agua para su uso doméstico (Degremont, 1979).

Las mayores demandas de agua potable, junto con las prolongadas sequías que han afectado a zonas como el sur de España, han originado problemas de escasez de recursos hídricos. Para solucionarlo se buscaron nuevos recursos, llegando al empleo de tecnologías como la ósmosis inversa o el intercambio iónico. Debido a estos procesos se pueden emplear como recurso hídrico agua salobres o marinas.

Junto con la escasez de agua, surgen otros problemas como la contaminación de los recursos hídricos. Esta contaminación es originada generalmente por el propio desarrollo económico. La fuerte expansión industrial y las nuevas prácticas agrícolas afectan negativamente al agua, generando problemas como la eutrofización de embalses o la contaminación de aguas subterráneas. Estos efectos originan graves problemas socio-económicos, al no poder emplearse los recursos o precisar un mayor gasto económico en su tratamiento.

Estas nuevas prácticas, originarias del fuerte desarrollo, dan lugar a la aparición en el agua de sustancias que alteran su calidad. Entre ellas se pueden citar los pesticidas (Kolpin and Goolsby, 1995), metales pesados (Karpuzcu *et al*, 1996) o nutrientes como N y P (Aoi and Hayashi, 1996; Appan and Ting, 1996). La presencia de estas sustancias en el agua, demanda soluciones técnicas para eliminarlas y son hoy día preocupación de la comunidad científica.

Nuevas técnicas como las ya nombradas ósmosis inversa, el intercambio iónico (Afcharion *et al*, 1997), los filtros de carbón activo (Schalz and Martin, 1997) o los procesos biológicos (Vолоkita *et al*, 1996), son aplicaciones que surgen como solución a la presencia de estos nuevos tóxicos en el agua.

No podemos olvidar que entre los caracteres que priman para el empleo de un recurso hídrico, no solo está la posibilidad de potabilizarlo, sino también el coste económico del proceso. Es por ello que los nuevos sistemas de depuración demandados no solo han de ser viables técnicamente, sino también económicamente. Con esta idea, los procesos biológicos, que ya dan buenos resultados en el tratamiento de aguas residuales (Zamorano *et al*, 1996a) surgen como una alternativa viable técnica y económicamente a los procesos fisico-químicos, en cuanto a la eliminación de los contaminantes del agua.

## **7.- PROCESOS BIOLÓGICOS DE DEPURACION .**

Las primeras aplicaciones de los procesos biológicos de depuración fueron en Alemania a principios de siglo (Bitton, 1994), empleándose los sistemas de biopelícula fija. A estas biopelículas se les han achacado muchos problemas que afectan al hombre tales como los procesos de corrosión de tuberías (Odom, 1990), las corrosiones de la piedra en los edificios antiguos o algunos efectos que pueden afectar a la salud como, la formación de biopelículas en sistemas de conducción de agua potable (Sobsey and Olson, 1983). Sin embargo su carácter depurador puede aprovecharse por el hombre, aplicándolo en sistemas de depuración mediante soporte fijo.

Tras publicarse en 1914 una patente por Arden y Lockett denominada "Sewage purification without filter", estos sistemas de biopelícula fueron desplazados por otro proceso biológico denominado fangos activados, que hoy en día es empleado en la mayoría de las grandes plantas depuradoras de todos los países. A mediados de la década de los 80, los sistemas de biopelícula vuelven a tener un pequeño auge, incorporándose a los sistemas de tratamiento de muchos núcleos, pero a niveles muy lejanos del sistema convencional de fangos activados.

Las grandes necesidades de espacio, así como el alto coste de instalación y mantenimiento de los sistemas de fangos activados, da pie a nuevas investigaciones en el campo de los sistemas de biopelícula fija. En la segunda mitad del siglo, se observa un progreso en las investigaciones, apareciendo nuevos tipos de rellenos y un mejor conocimiento del sistema. Tras esto, muchos investigadores se lanzan al estudio de los sistemas de biopelícula, destacando el centro de investigación de Anjoux en Francia (Lacamp *et al* 1993).

Autores como Gras y Alvarez (1991) encontraron en los procesos de biopelícula fija numerosas ventajas con respecto a los sistemas de fangos activados:

- Reducción de la producción de ruidos.
- Reducción de los olores.
- Reducción de la superficie necesaria.
- Adaptación a la eliminación de sustancias biodegradables, presentes en bajas concentraciones.
- Reducción del tiempo de retención del agua en planta.
- Menor riesgo de desequilibrios en la biomasa por acción de agentes contaminantes.
- Explotación fácil y segura.

Estas ventajas hacen que se avance en la investigación de los sistemas de biopelícula fija, para su uso en el tratamiento de aguas residuales. Dentro de este campo se emplean en sistemas de oxidación de materia orgánica (Zamorano *et al*, 1996), nitrificación (Thörn *et al*, 1996),

desnitrificación (Hirata and Meutin, 1996), eliminación de fósforo (Garzón-Zúñiga and González-Martínez, 1996) o digestión anaeróbica (Harremoes, 1978).

Hoy día surgen nuevas aplicaciones como son el uso para la eliminación de xenobióticos presentes en el agua (Galil, 1994), la eliminación de metales pesados (Liehr *et al*, 1994) o los procesos de potabilización de aguas contaminadas, mediante la eliminación selectivas de nutrientes como el nitrógeno (Hontoria *et al*, 1993). Todos estos procesos abren nuevos campos de investigación, en los que las biopelículas son las responsables directas del proceso depurador del agua.

### **7,1.- SISTEMAS DE BIOPELICULA FIJA MAS EMPLEADOS.**

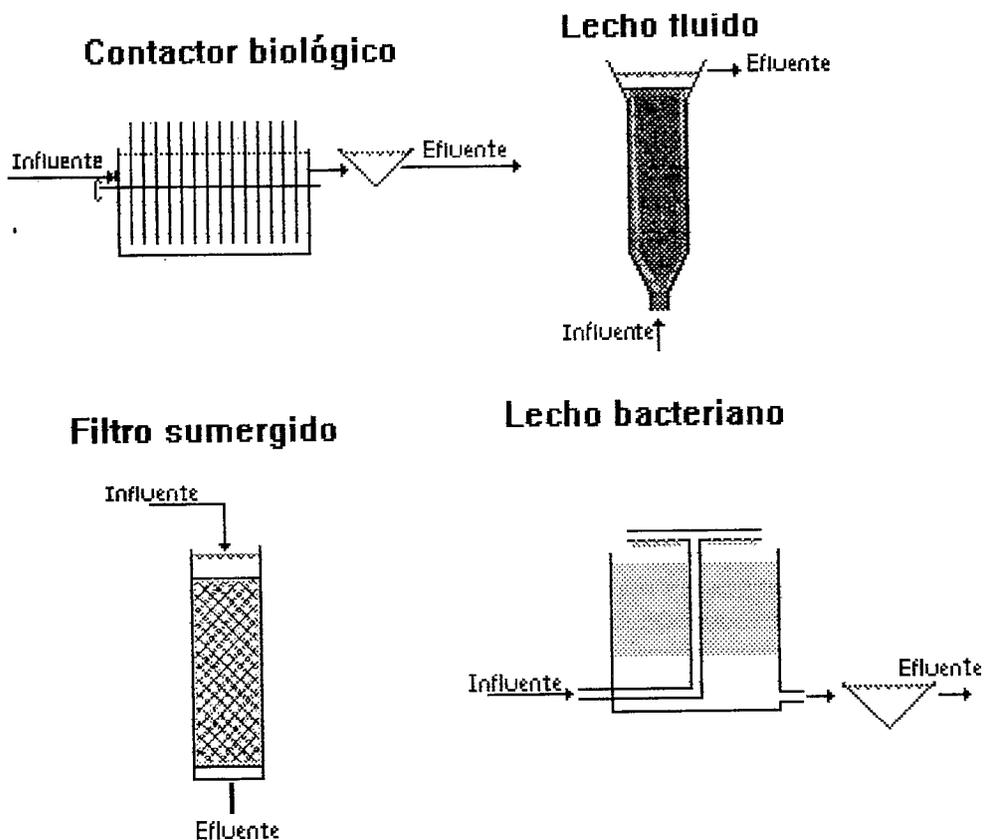
De entre los diferentes sistemas de biopelícula fija , los más empleados por su economía y factible aplicación son los lechos bacterianos, contactores biológicos rotativos, lechos fluidos y filtros sumergidos ( Boller et al, 1994; Harremoes, 1978; Jansen et al, 1994).

Los lechos bacterianos se introdujeron en 1890 como uno de los principales sistemas para el tratamiento biológico de aguas residuales. Estos métodos consisten en un material de relleno, bien de tipo tradicional, como basaltos, coque o piedras silíceas trituradas o de tipo plástico sobre el cual se desarrolla una biopelícula que permite una gran superficie de contacto con el agua a tratar. El agua se adicionará al lecho mediante un distribuidor que permite mantener una carga hidráulica uniforme. La biopelícula será la responsable de eliminar la materia orgánica y nutrientes al tomar contacto con el agua manteniéndose la oxigenación por el paso de aire de forma natural entre los huecos del material soporte. El agua tratada se recoge en el fondo para enviarla a un clarificador que separará por decantación los restos de biopelícula desprendidos.

De entre los diferentes tipos de contactores biológicos rotativos, los más habituales consisten en unos discos que giran alrededor de un eje horizontal dentro de un tanque, estando los discos sumergidos aproximadamente un 60% en el agua a tratar. Sobre los discos se

desarrollará una biopelícula responsable de la depuración, la cual al salir del agua por la rotación del sistema retiene oxígeno, que en la fase de sumergido será empleado por los microorganismos para la oxidación de la materia orgánica.

La biopelícula en estos sistemas crece al consumirse la materia orgánica y se desprende al alcanzar cierto tamaño. Las partes internas de la biopelícula no captan nutrientes necesarios, esto da lugar a un déficit de nutrientes en las capas internas que causan su muerte y posterior desprendimiento. Esto permite una constante regeneración de la biopelícula. Con estos sistemas se logra un bajo tiempo de retención y pocas operaciones para su mantenimiento.



*Figura 6.- Esquema de los reactores de biopelícula más empleados.*

Los lechos fluidos se comenzaron a introducir en los años setenta. Estos sistemas consisten en un material de relleno sobre el cual se desarrolla la biopelícula, introducido en un reactor. Este relleno es movido bien por el flujo ascendente del agua o por aire, formando un lecho fluidificado.

La principal aplicación de estos sistemas está destinada a la depuración de aguas residuales mediante procesos aeróbicos, sin embargo presentan entre sus problemas, la necesidad de una alta energía para movilizar todo el lecho y el gran volumen ocupado por el material de relleno (30-40%).

## **7.2.- FILTROS SUMERGIDOS**

En los años ochenta se introduce en Francia y Japón un nuevo sistema de depuración biológica denominado filtro sumergido. Este sistema se comenzó a emplear como sistema de pretratamiento para aguas contaminadas útil para eliminar  $\text{NH}_4^+$ , carbono orgánico, fitoplacton, olor ó sabor del agua (Takasaki, 1989). Este proceso destacó como alternativa más económica que los sistemas fisico-químicos y hoy día se investiga sobre sus posibilidades de reemplazar a los sistemas de fangos activados.

Las ventajas que este sistema presenta frente a los procesos convencionales de depuración biológica de aguas residuales, han sido descritos por varios autores (Meany and Strickland, 1993; Zamorano et al 1996). Dentro de estas ventajas destacan:

- Admite mayores cargas orgánicas, por lo que hay un menor volumen del reactor.
- Se suprime la decantación secundaria, por lo que disminuye la superficie precisada para la instalación.
- Facilidad de automatización del sistema.

- Posibilidad de ubicarlo en superficies cerradas.
  
- El costo de instalación y mantenimiento es bajo.

Estos sistemas consisten en material de relleno que actúa como soporte de la biopelícula, pero a diferencia de los otros, el material de relleno está inmóvil y completamente sumergido en el agua. La biopelícula será la encargada de la depuración, pero a su vez el relleno actúa como un filtro (Rogalla, *et al* 1992; Zamorano *et al*, 1996).

Uno de los principales problemas que presenta este sistema son los atascos producidos bien por el crecimiento de la biopelícula o por los sólidos retenidos.

A parte de su uso como tratamiento secundario, ya a finales de los ochenta se propone este sistema como un tratamiento terciario útil para la eliminación de nutrientes como el nitrógeno, que se realiza vía nitrificación desnitrificación, u otros como el fósforo ó xenobióticos (Jansen *et al* 1993).

El problema del nitrógeno se hace más patente a lo largo de los últimos dos decenios. Esto llevó a pensar en la aplicación de sistemas que lo eliminasen de las aguas residuales tratadas e incluso aplicarlo en la potabilización de aguas contaminadas con nitrato. Los sistemas aplicados para este fin fueron los lechos fluidos y los filtros sumergidos, los cuales según Lacamp (1993) son el sistema más factible para la eliminación selectiva del nitrato en aguas subterráneas contaminadas.

En estos sistemas la biopelícula se encarga, mediante desnitrificación, de eliminar selectivamente el  $\text{NO}_3^-$  sin alterar el resto de componentes del agua. Esta aplicación de los filtros sumergidos a la desnitrificación biológica de aguas potables, precisa en todo momento la adición de una fuente de carbono para su buen funcionamiento (Hontoria *et al*, 1993), presentándose como una alternativa útil y económica a la descontaminación de aguas subterráneas contaminadas

con nitrato.

## **8.- BIOPELICULAS**

El principal responsable de la depuración realizada por los sistemas de biofiltros son las biopelículas. Estas se pueden considerar como agrupaciones de células simples o microcolonias embebidas en una matriz polimérica de origen microbiano, formada sobre un sustrato (Zhang and Bishop, 1994). Dichos sistemas pueden tener su origen en la adherencia de un microorganismo, principalmente bacterias, a un sustrato mediante la producción de polisacáridos. Sobre esta matriz polimérica se pueden unir otros microorganismos tales como bacterias, hongos, protozoos, algas, larvas, etc formando un sistema biológico complejo. La diversidad biológica que forma las biopelículas, así como la peculiar forma de organizarse la estructura, dan lugar a un sistema singular cuya principal característica es la heterogeneidad (Loodrecht et al, 1995).

### **8,1.- ESTRUCTURA DE LAS BIOPELICULAS**

En cuanto a la estructura de las biopelículas hay diferentes hipótesis que tratan de explicarla. Algunos autores las consideran como sistemas estratificados que crecen de modo perpendicular al sustrato (Bishop, 1996). En estos sistemas habría una transferencia de masas desde la capa superficial a la interna. Otros autores como Lewandowski et al (1995), estudian las biopelículas mediante observaciones tridimensionales, llegando a la conclusión de que son estructuras heterogéneas muy canalizadas, canales que están llenos de agua, circulando por ellos los nutrientes (Beer and Standley, 1995).

Wimpennig y Calasauti (1997) no solo aceptaron la posibilidad de darse los dos modelos anteriormente descritos, sino que añaden uno más, como son las biopelículas densas, tales como las que se forman en la dentadura. Tras observar la formación de colonias en los medios de cultivo por Bacillus licheniformis vieron que formaba colonias redondeadas y muy mucosas si el medio

es rico en nutrientes y formas arracimadas si los nutrientes son escasos. Basándose en esto achacan a la concentración de nutrientes la formación de biopelículas más o menos densas o canalizadas.

Esta concentración de nutrientes puede influir sobre propiedades estructurales de las biopelículas, tales como el espesor, densidad o la porosidad, propiedades que también varían por las condiciones hidrodinámicas del sistema, tipo de microorganismos que la compongan o bien por los diferentes grupos fisiológicos presentes en la biopelícula (Lazarova, et al 1992; Loosdrech et al, 1995).

Todos los factores anteriormente citados, se influncian a su vez entre si, así la concentración de nutrientes y el tipo de estos, condicionarán el desarrollo de unos grupos fisiológicos u otros. Un sistema con una alta carga orgánica dará biopelículas con alto contenido en heterótrofos en la superficie, que a su vez limitarán la difusión de nutrientes al interior (Okabe et al 1995).

El espesor de una biopelícula se verá también limitado por la concentración de nutrientes y este a su vez puede influir en el mayor o menor número de células vivas. Zhang and Bishop (1994) observaron que las células vivas podían variar del 82 - 89% en la superficie a un 5 - 11% en las capas profundas de una biopelícula espesa, sin embargo para una biopelícula poco espesa, la variación puede oscilar entre el 83-86% en la superficie al 57-63% en las capas más internas.

Estas oscilaciones entre la superficie y las capas profundas afecta tambien a la actividad metabólica, la cual está presente en la mayoría de las células vivas de la superficie y entre 1/4 a 1/7 de las células vivas en las capas profundas. Estas capas profundas se compondrá de 2/3 de material inerte y gran cantidad de células en estado latente. Estas capas internas son a su vez más densas y menos porosas que las superficiales (Bishop et al, 1995).

El crecimiento de toda biopelícula será el resultado de la transferencia de masas y su

posterior transformación por parte de los componentes de la biopelícula. Los nutrientes circularán a través de ella de dos modos, uno sobre los canales o las capas superficiales mediante difusión o convección y en las capas celulares mediante fenómenos de transporte de masas (Beer and Stoodley, 1995).

La densidad limitará el transporte de nutrientes al igual que el descenso de la porosidad, por lo que las capas más internas tendrán limitado su paso incluido el del O<sub>2</sub> (Bishop, 1995). Este fenómeno será más intenso cuanto mayor sea el espesor de la biopelícula, justificándose así la menor cantidad de células vivas y poca actividad metabólica de las capas internas.

La limitación de nutrientes provocará también una variación en cuanto a las comunidades microbianas que pueblan la biopelícula. Hay una estratificación en los grupos fisiológicos debido fundamentalmente a la limitación en la transferencia de O<sub>2</sub> así como a la del resto de nutrientes. Así biopelículas en contacto con agua con alta carga orgánica y alta concentración de oxígeno disuelto, presentarán unas capas superficiales más ricas en heterótrofos aerobios y las capas más profundas se formarán principalmente por microorganismos anaerobios.

## **8.2.- COMPOSICIÓN MICROBIOLÓGICA DE LAS BIOPELÍCULAS**

Los principales componentes de una biopelícula son las bacterias, las cuales a su vez son responsables de su formación. Ahora bien, las diferentes comunidades microbianas que las componen varían, influyendo en ello los factores ambientales que rodean a la biopelícula.

La presencia de bacterias heterótrofas o autótrofas, los nitrificantes y desnitrificantes, etc, varían en función de la cantidad y tipo de nutrientes presentes en el medio donde se desarrollan. Zhang and Bishop (1994a) estudiaron la composición de diferentes biopelículas en función de la cantidad y tipo de nutrientes empleados. Si en el medio había materia orgánica, las bacterias heterótrofas estaban presentes en gran cantidad en la biopelícula y sus recuentos no variaban con la profundidad. Por lo contrario, los nitrificantes solo aparecían en grandes cantidades cuando

el medio les era favorable y en ellas se apreciaba mayor variación con la profundidad de la biopelícula. Esta variación responde a sus condiciones de desarrollo favorables, ya que en capas intermedias hay menos materia orgánica y una concentración de oxígeno adecuada para su actividad. Esto mismo sucede con otras comunidades como los desnitrificantes que se desarrollan en biopelículas nitrificantes, los cuales aparecen en las capas profundas, donde no hay oxígeno y si nitrato procedente de la actividad nitrificante (Bishop *et al*, 1995). Las variaciones de la concentración de oxígeno con la profundidad de la biopelícula, son responsables también de la variación con la profundidad de las bacterias facultativas.

La composición bacteriana de una biopelícula varía pues, en función de la disponibilidad y tipo de nutrientes, así como en la capacidad de difusión de estos al interior de dicha biopelícula. Hay que tener también en cuenta que dentro del mismo tipo de nutrientes (materia orgánica), la presencia de unos u otros compuestos permiten la proliferación de diferentes especies bacterianas dentro del mismo grupo (Kavanaugh and Randall, 1994). Por lo tanto, la composición microbiológica de una biopelícula responde a la capacidad de de los diferentes grupos bacterianos de adaptarse a las condiciones del medio donde se desarrollan estas.

No solo las bacterias componen la biopelícula. Otros microorganismos como los protozoos, hongos, rotíferos, nematodos, anélidos e insectos, pueden formar parte de ellas (Bitton, 1994). Su capacidad de desarrollo obedece a la posibilidad de adaptarse al medio, encontrando en las biopelículas los nutrientes que precisan para su desarrollo.

### **8.3.- COMPOSICION QUÍMICA DE LAS BIOPELICULAS**

La principal característica a resaltar en cuanto a la composición química de una biopelícula es que son sistemas altamente hidratados. Presentan un contenido importante en agua la cual les da una consistencia viscosa y supone una protección frente a la desecación (Roberson and Firestone, 1992). Este contenido en agua facilita la transferencia de los nutrientes que contiene el agua que contacta con la biopelícula.

Según Flemming (1995) el 90% del total de una biopelícula está formado por exopolisacáridos (EPS) de origen microbiano. Este EPS rodea a todos los grupos celulares y sirve de nexo entre la biopelícula y el sustrato. La gran cantidad de grupos polares presentes en el EPS le permiten jugar un papel importante en la captación y transferencia de nutrientes hacia las células. Algunos de los grupos polares descritos en el EPS son:

- Grupos catiónicos de amino-azúcares y proteínas.



- Grupos aniónicos de ácidos uránicos y proteicos.



- Grupos apolares de proteínas (Grupos aromáticos de aminoácidos).
- Grupos con alto poder formador de puentes de hidrógeno (polisacáridos).

Estos grupos polares, así como la composición varía en función de los grupos fisiológicos o microorganismos presentes en la biopelícula, así el EPS producido por cepas gram - se compone de lipopolisacáridos, polisacáridos capsulares y otros polisacáridos y proteínas excretadas. Las cepas gram + sin embargo producen un EPS más rico en proteínas y ácidos orgánicos. Esta composición varía incluso con el tiempo, al ser capaces la misma cepa de producir diferente tipo de EPS según la presencia de nutrientes o la fase del ciclo de vida.

Lógicamente la presencia de estos grupos polares permitirá un cambio catiónico y aniónico en la biopelícula, en función del pH del sistema. Esto supone una capacidad de captación de nutrientes por parte de las células embebidas en la matrix polisacáridica.

Junto con los polisacáridos aparecen gran cantidad de proteínas, las cuales son tanto extracelulares, secretadas por las células, o bien intracelulares y procedentes de la lisis celular. La mayor o menor concentración de proteínas afectará a la capacidad adherente de la biopelícula, que aumentará si aumenta su concentración. También se afectarán otras propiedades estructurales y

pueden desempeñar ciertas funciones enzimáticas.

La concentración de proteínas en una biopelícula dependerá entre otros, del tipo de microorganismos que compongan la biopelícula, así como de factores nutricionales como la concentración en materia orgánica que aumentarán su concentración o del O<sub>2</sub> disponible, cuya limitación descende la concentración en proteínas (Jonh et al, 1996).

También se describe en las biopelícula la presencia de ADN, debido a la lisis celular o a la excreción bacteriana (Jonh and Nielsen, 1995). Su concentración puede variar por la concentración de O<sub>2</sub>, cuya ausencia la aumenta (Jonh et al, 1996).

Otros compuestos presentes en las biopelículas son sustancias hidrolizadas de procedencia celular, o bien productos de excreción como ácido uránico o ácidos húmicos. De la concentración de todos ellos dependerán propiedades tales como fuerza, elasticidad o capacidad de adsorción.

## **II.- Objetivos.**

---

El ciclo del nitrógeno, al igual que el resto de los ciclos biogeoquímicos, se presenta en la naturaleza en perfecto equilibrio, manteniendo las concentraciones adecuadas de cada una de sus formas químicas. La influencia humana sobre el ciclo es causa de alteración y descomposición en los equilibrios (Martínez-Toledo, 1992).

El  $N_2$  es el compuesto más abundante de la atmósfera, sin embargo no es asimilable por los seres vivos, precisando para ello su transformación en otras formas inorgánicas como el  $NH_4^+$  ó  $NO_3^-$ . Estas transformaciones se dan en la naturaleza bien de forma espontánea, interviniendo las descargas eléctricas de las tormentas o la radiación UV, o bien por procesos biológicos de fijación de nitrógeno realizados por bacterias. Las diferentes formas de nitrógeno asimilable son de nuevo devueltas a la atmósfera en forma de  $N_2$  por los procesos biológicos de la desnitrificación.

Debido a la utilidad del  $NO_3^-$  en las industrias de armamento y al efecto beneficioso que sobre la agricultura producen los fertilizantes nitrogenados, el hombre trató de sintetizar por procesos físico-químicos compuestos asimilables de nitrógeno, lográndolo mediante el proceso de Haber-Bosch (Sanchís-Moll, 1990). Estos aportes antrópicos al medio incrementan la entrada de nitrógeno asimilable al ciclo, no siendo la naturaleza capaz de devolverlos a la atmósfera en forma de  $N_2$ . Debido a esto se producen acumulaciones de compuestos nitrogenados en el medio, que dan lugar a los fenómenos de contaminación.

Junto con la eutrofización, la consecuencia más inmediata de estos aportes antrópicos de nitrógeno es la contaminación de los acuíferos con  $NO_3^-$ . Este anión forma parte de la composición de muchos fertilizantes químicos, aportándose en grandes cantidades en el abonado. Debido a su alta solubilidad, es un ión muy móvil en el suelo, por lo que fácilmente puede ser arrastrado por los lixiviados que recargan los acuíferos (Collins and Jenkins, 1996).

Un alto consumo de  $NO_3^-$  por mamíferos y la reducción que sobre el produce la flora bacteriana intestinal, dan lugar a la formación de altas concentraciones de  $NO_2^-$ , el cual puede

producir efectos nocivos sobre la salud (Fritsch y Saint-Blanquat, 1990). Es por ello que se debe evitar el consumo de aguas contaminadas con este anión, quedando inutilizados para su empleo en abastecimiento muchos acuíferos. Estos problemas son más graves en épocas de sequía, en las que el agua subterránea se convierte en el único recurso hídrico disponible para muchas zonas. Por otro lado se debe considerar que hay poblaciones que solo cuentan con este recurso, por lo que la contaminación de los acuíferos demanda una inmediata solución.

Hoy día hay procesos como la ósmosis inversa o el intercambio iónico (Sheng and Chang, 1996) capaces de eliminar cualquier ión presente en el agua, sin embargo y debido a que los núcleos urbanos más afectados por estos problemas, suelen ser pequeñas poblaciones con recursos económicos limitados, estos sistemas no son los más factibles, precisando de nuevos procesos con menos coste de explotación y mantenimiento. Por otro lado hay que indicar que estos sistemas no transforman los compuestos asimilables de nitrógeno, tan solo los separan del agua, obteniendo una salmuera que crea nuevos problemas para su vertido.

En vista de que el principal problema radica en una acumulación de compuestos de nitrógeno asimilables en el medio, por un incremento en la entrada de estos en el ciclo del nitrógeno, se podría actuar de dos modos para evitarlo: limitando las entradas o bien incrementando las salidas.

Las actuales prácticas agrícolas, responden a una economía de mercado que precisa mayor producción con menor coste económico. Esta tendencia, así como las necesidades de venta de los fabricantes de abonos químicos, hacen que sea difícil y costosa la limitación del uso de estos productos (Rohman and Sontheimer, 1985), a pesar de las restricciones legales. Se hace por ello preciso idear sistemas de eliminación del  $\text{NO}_3^-$  disuelto en el agua contaminada, mediante transformación en compuestos no contaminantes.

La desnitrificación biológica es una fase del ciclo del nitrógeno mediante la cual compuestos como el  $\text{NO}_3^-$  y el  $\text{NO}_2^-$  son transformados en gas  $\text{N}_2$  (Payne, 1981), ofreciendo este

proceso una salida de compuestos asimilables del nitrógeno del ciclo biogeoquímico. Es un proceso respiratorio exclusivo de procariotas, cuyos hábitats principales suelen ser el agua y el suelo, siendo sobradamente conocido el efecto inhibitor que produce el oxígeno, la influencia que tiene el pH y la temperatura ó las necesidades de una fuente de carbono que requiere (Knowles, 1982).

Al margen de los avances de la ciencia en el conocimiento de la desnitrificación biológica, desde principios de siglo surgieron los procesos de depuración biológica del agua mediante biopelículas. Estas biopelículas son agrupaciones bacterianas embebidas en una matriz polimérica mediante la cual se unen a un sustrato. En su interior se dan procesos de transferencia de masas que permiten el paso de nutrientes desde la superficie hasta el interior (Christensen and Characklis, 1990).

Las biopelículas son formaciones naturales realizadas a partir de una bacteria capaz de unirse a un sustrato, la cual al multiplicarse da lugar a la formación de la biopelícula. Estas adaptaciones bacterianas al medio, les permiten captar mayor número de nutrientes, facilitando así su desarrollo (Percival et al, 1998). Su empleo en depuración de aguas permite eliminar los contaminantes presentes en esta, al consumirlos los microorganismos de la biopelícula. Los avances dados en el último cuarto de siglo en temas de depuración de aguas, han llevado a aplicar estos procesos a la eliminación de una serie de contaminantes entre los que se incluyen los nutrientes como el  $\text{NO}_3^-$ .

Son variados los sistemas empleados para la aplicación de las biopelículas a la depuración, pero los que mejores resultados han ofrecido en la eliminación de nutrientes para obtener aguas potables son los denominados filtros sumergidos (Lacamp *et al*, 1993). Estos sistemas consisten en un material de relleno sobre el cual se desarrolla la biopelícula responsable de la depuración, manteniéndose esta constantemente inundada de agua. La aplicación de las condiciones idóneas para potenciar el desarrollo de los microorganismos desnitrificantes presentes en la biopelícula, facilitando así su acción sobre el  $\text{NO}_3^-$  disuelto en el agua contaminada, ofrece una alternativa de

tratamiento a las aguas subterráneas contaminadas con este anión.

Siguiendo estas ideas y con la meta de obtener un sistema técnica y económicamente viable, que nos permita solventar los problemas de contaminación del agua de los acuíferos por  $\text{NO}_3^-$ , nos planteamos este trabajo de investigación titulado: *Eliminación biológica de  $\text{NO}_3^-$  de aguas subterráneas mediante filtros sumergidos: Optimización del sistema.*

En dicha investigación nos planteamos estudiar la posible influencia que la fuente de carbono (tipo y concentración aplicada) puede tener en el rendimiento de eliminación de nitrato mediante filtros sumergidos. Para ello se planteó una serie de ensayos comparativos de tres diferentes fuentes de carbono, estudiando no solo sus rendimientos, sino también buscando la causa de estos en la composición de la biopelícula, tipo de bacterias desnitrificantes implicadas y su actividad. Por otro lado y debido al efecto negativo que el oxígeno ejerce sobre el proceso, se pretendió igualmente conocer de que modo podría afectar al proceso depurador y los posibles cambios que la presencia de oxígeno producirían en la composición de la biopelícula.

A modo de aproximación a los parámetros de diseño del filtro sumergido, se estudió la influencia que sobre el rendimiento y la composición de la biopelícula podrían tener las variaciones de carga hidráulica y carga de nitrato.

Con este estudio se pretendía avanzar en el conocimiento del proceso de eliminación de  $\text{NO}_3^-$ , mediante desnitrificación biológica en filtros sumergidos a escala semi-técnica, permitiéndonos mejorarlo técnica y económicamente, aplicándolo posteriormente a escala industrial. Para abordar este trabajo con este objetivo principal, nos marcamos una serie de objetivos parciales:

- 1º Estudio de la influencia de la concentración y tipo de fuente de carbono en la capacidad de eliminación de  $\text{NO}_3^-$  del agua subterránea contaminada, mediante filtros sumergidos.

- 2° Influencia del oxígeno disuelto en el agua a tratar, sobre el rendimiento del filtro sumergido en la eliminación de  $\text{NO}_3^-$ . Estudio comparativo de su influencia según fuentes de carbono.
- 3° Estudio de la variación en la composición y tamaño de la biopelícula, en función de la presencia de oxígeno, la concentración y tipo de fuente de carbono empleada.
- 4° Caracterización de las especies bacterianas desnitrificantes que componen la biopelícula.
- 5° Estudio de la actividad desnitrificante de las diferentes especies bacterianas aisladas de la biopelícula.
- 6° Efecto de la variación de carga de nitrato en el rendimiento del sistema, así como en el tamaño y composición de la biopelícula. Estudio a diferentes alturas y en presencia y ausencia de oxígeno.
- 7° Efecto de la variación de caudal en el rendimiento del sistema, así como en el tamaño y composición de la biopelícula. Estudio a diferentes alturas y en presencia y ausencia de oxígeno.

La consecución de estos objetivos nos aportará datos sobre la influencia de la composición microbiológica de la biopelícula en el rendimiento del filtro sumergido, así como de las condiciones de trabajo que permiten el desarrollo de una determinada biopelícula. Con ello se pretende avanzar en el conocimiento de las características de diseño así como en las condiciones de trabajo. Estos logros nos permitirán abordar posteriores ensayos a escala industrial, ofreciendo una solución viable al problema de la contaminación de los acuíferos con  $\text{NO}_3^-$ .

### **III.- Materiales y Métodos.**

---

## **1.- PLANTA PILOTO.**

### **1.1.- UBICACIÓN**

Para la ubicación de la planta piloto a escala semi industrial, se precisaba disponer de un volumen de agua tal, que se pudiese llevar a cabo la investigación. Dentro de los objetivos planteados se encontraba el estudio de la influencia de la carga hidráulica, para lo cual se varió el caudal de entrada llegando a un máximo de 54 l/h, equivalente a un caudal diario de 1.3 m<sup>3</sup>. Dado que la investigación estaba destinada al tratamiento de aguas subterráneas, se precisaba contar con agua de acuífero, que incluso presentase problemas de contaminación por NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

El acuífero de la vega de Granada (Figura 7), registró en los último años un incremento importante en la concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, llegando a catalogarse por la Junta de Andalucía como contaminado por el uso abusivo de fertilizantes en la agricultura (Anom, 1995). Sobre este acuífero se sitúa la Estación Depuradora Puebte de los Vados, propiedad de la Empresa Municipal de Aguas de Granada S.A. (EMASAGRA), la cual a su vez contaba con una captación del mencionado acuífero, siendo este el lugar de ubicación.

Contando en todo momento con la colaboración de la empresa, se construyó un habitáculo mediante estructura metálica, de 10 m<sup>2</sup> de superficie por 5 metros de altura, dotado de toma de energía, con potencia suficiente para poder instalar los sistemas de bombeo y con suministro directo de agua procedente del acuífero, instalándose en su interior la planta piloto.

### **1.2.- DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA PILOTO**

Los primeros trabajos en este campo, se realizaron por parte de nuestro grupo de investigación, en las instalaciones que la empresa ALJARAFESA S.A. tiene en la mancomunidad de municipios del Aljarafe (Sevilla), obteniendo unos resultados previos que confirmaban la viabilidad del proceso (Hontoria *et al* 1993). Con las ideas extraídas de estos primeros trabajos

y basándonos en las experiencias de Lacamp *et al* (1993) y Jansen *et al* (1994), se optó por emplear una planta piloto de filtros sumergidos para llevar a cabo la investigación.

La planta piloto consistió en un sistema de vasos comunicantes (Figura 8), lo cual nos permitió mantener constantemente inundado el filtro biológico. Este filtro se componía de un material soporte sobre el cual se desarrolló una biopelícula enriquecida en desnitrificantes, siendo esta la máxima responsable del proceso depurador. El agua contaminada se introdujo por un tubo paralelo pasando al cilindro principal por vasos comunicantes, siguiendo una trayectoria ascendente.

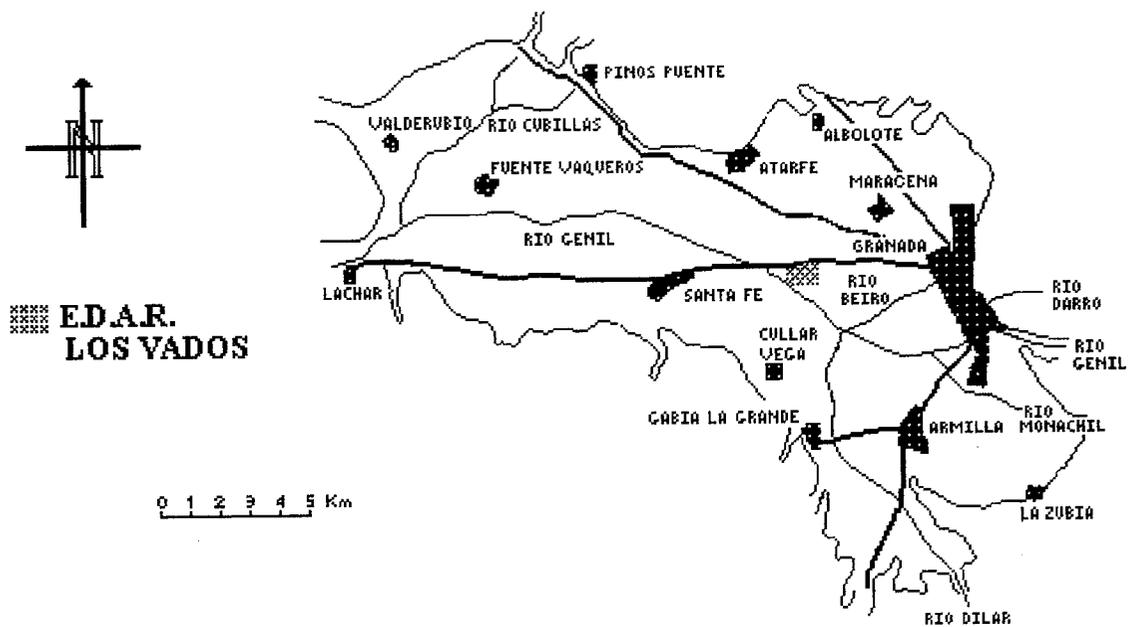


Figura 7. Ubicación de la planta semi-técnica, sobre el acuífero de la vega de Granada

La planta piloto se fabricó en metacrilato, contando con un cilindro central formado por tres cuerpos iguales unidos entre sí por bridas. En la parte baja del sistema se incorporó un falso fondo a través del cual se introdujo el agua mediante un tubo paralelo al principal. A lo largo del cilindro principal se dispusieron tres muestreadores de material de relleno y otros tantos para

muestreo de agua a diferentes alturas (Figura 10). Todo el sistema se instaló sobre una mesa metálica que a su vez sirvió de soporte del resto de instrumentos. Las dimensiones del sistema se detallan en la figura 9.

Dado a que el agua a depurar era rica en N y la necesidad de añadir P (0.06 mg/l), para que no fuese limitante, era probable que dentro del sistema y al dejar pasar el metacrilato la luz, se formasen algas que obstruyesen el sistema y aportasen cantidades no controlables de oxígeno al agua. Para evitar esto toda la planta se recubrió con un plástico negro, completamente opaco.

El agua necesaria se tomó mediante bombeo de un pozo del acuífero de la vega, almacenándola en dos depósitos de 1.7 m<sup>3</sup> de capacidad, cada uno. Este almacenaje nos permitió la manipulación del agua, previo a la entrada al sistema de tratamiento.

Para introducir el agua en la planta de tratamiento, se empleó una bomba dosificadora, tipo pistón (OBL/TFB<sup>®</sup>), capaz de proporcionar caudales regulables entre 0 y 100 l/h. El agua fue captada del fondo de los depósitos de almacenaje y llevada hasta la parte superior del tubo paralelo al reactor.

En el tubo de entrada a la planta piloto se dosificó la fuente de carbono, empleando para ello una bomba dosificadora de membrana (Dosapro Milton Roy<sup>®</sup>) capaz de proporcionar caudales regulables entre 0 y 25 ml/min. La fuente de carbono se almacenó en un depósito de 30l del que la tomó la bomba.

La planta piloto se cerró herméticamente, para evitar la entrada de aire y a su vez controlar el aire en su interior. Para facilitar la salida de gases, en la parte superior se dispuso de un tubo de salida, que permitió el escape del gas al superar la presión ejercida por una columna de agua situada al final del conducto. Esta columna de agua permitió controlar la presión al interior del sistema. En el falso fondo se dispuso una purga de gases, evitando así la acumulación de estos en la parte baja del sistema.

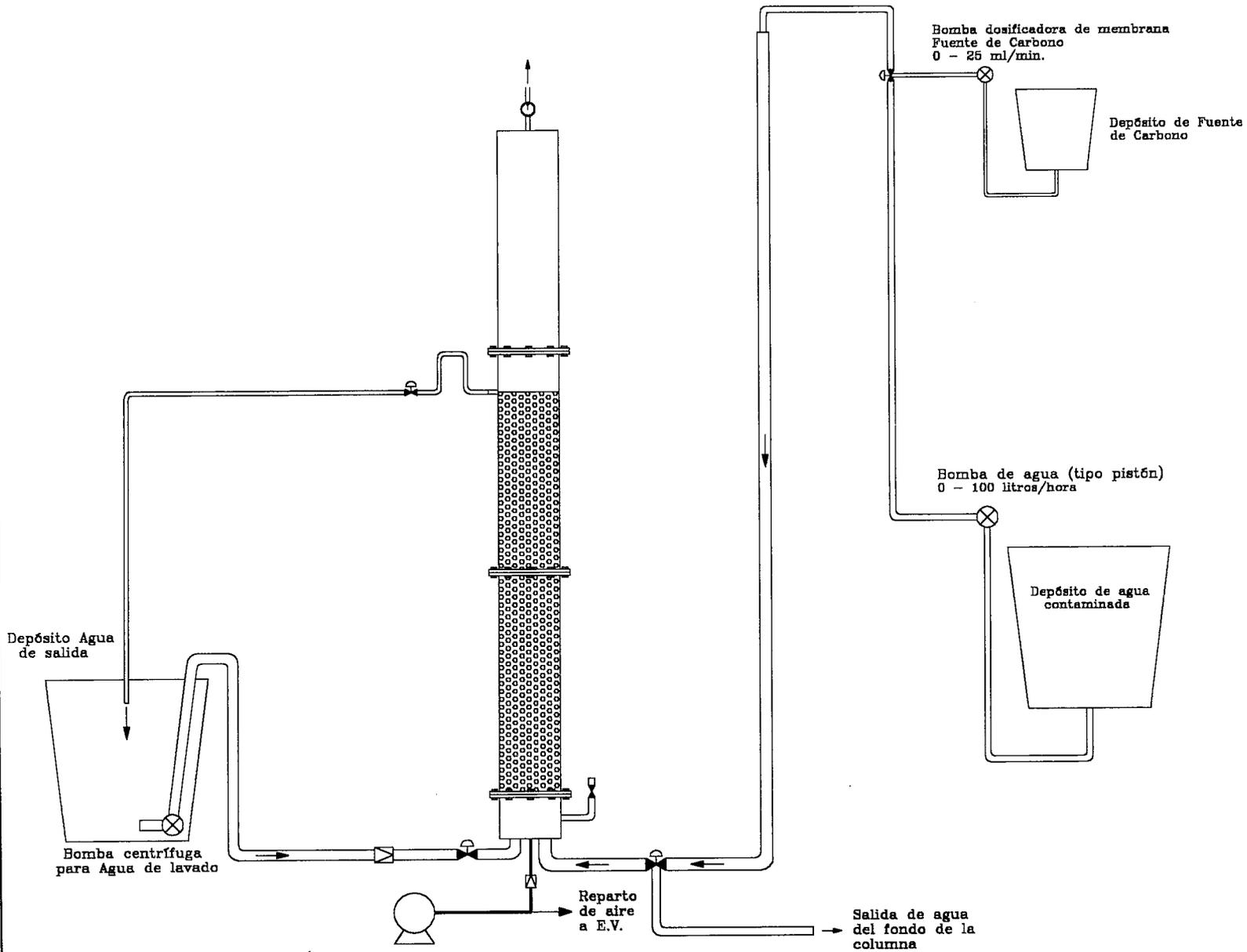


Figura 8. Esquema de la planta piloto empleada en la investigación

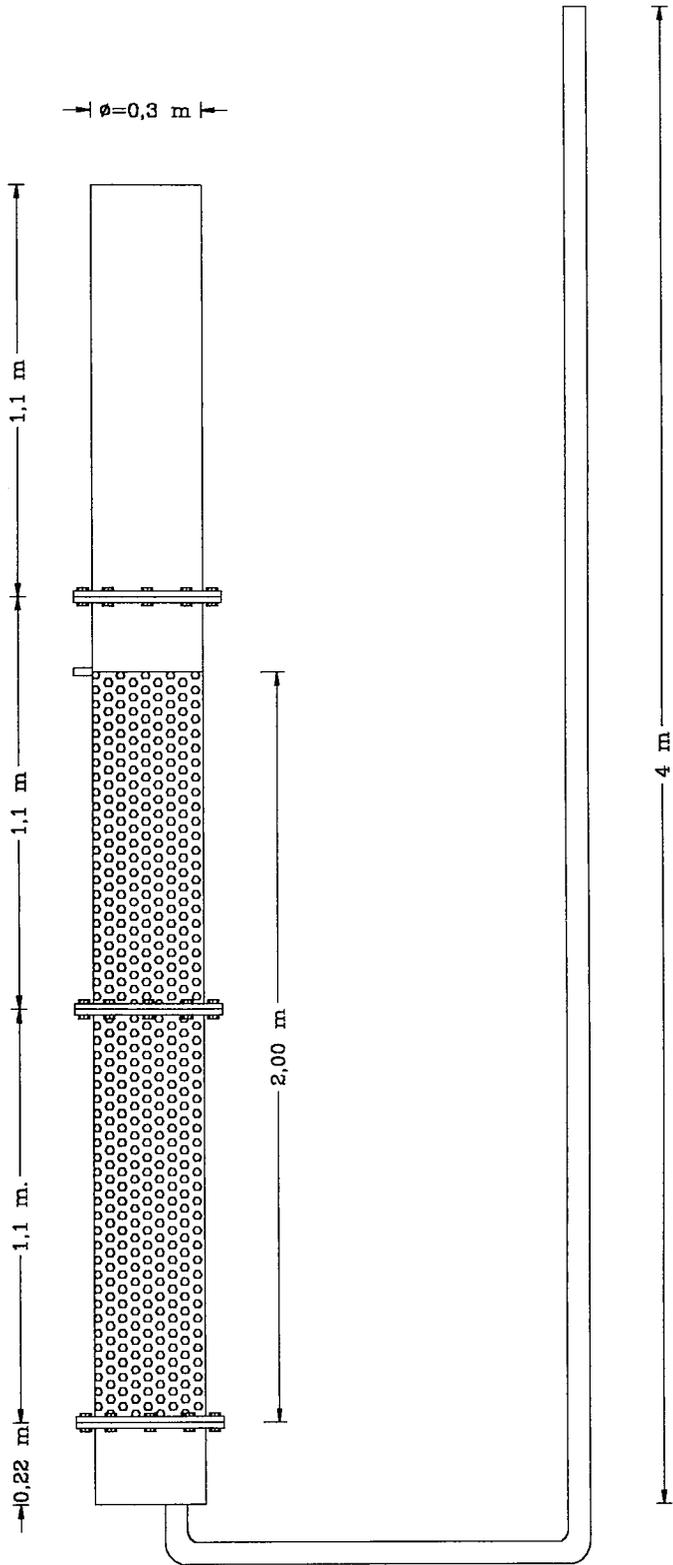


Figura 9. Dimensiones de la planta piloto a escala semi-técnica.

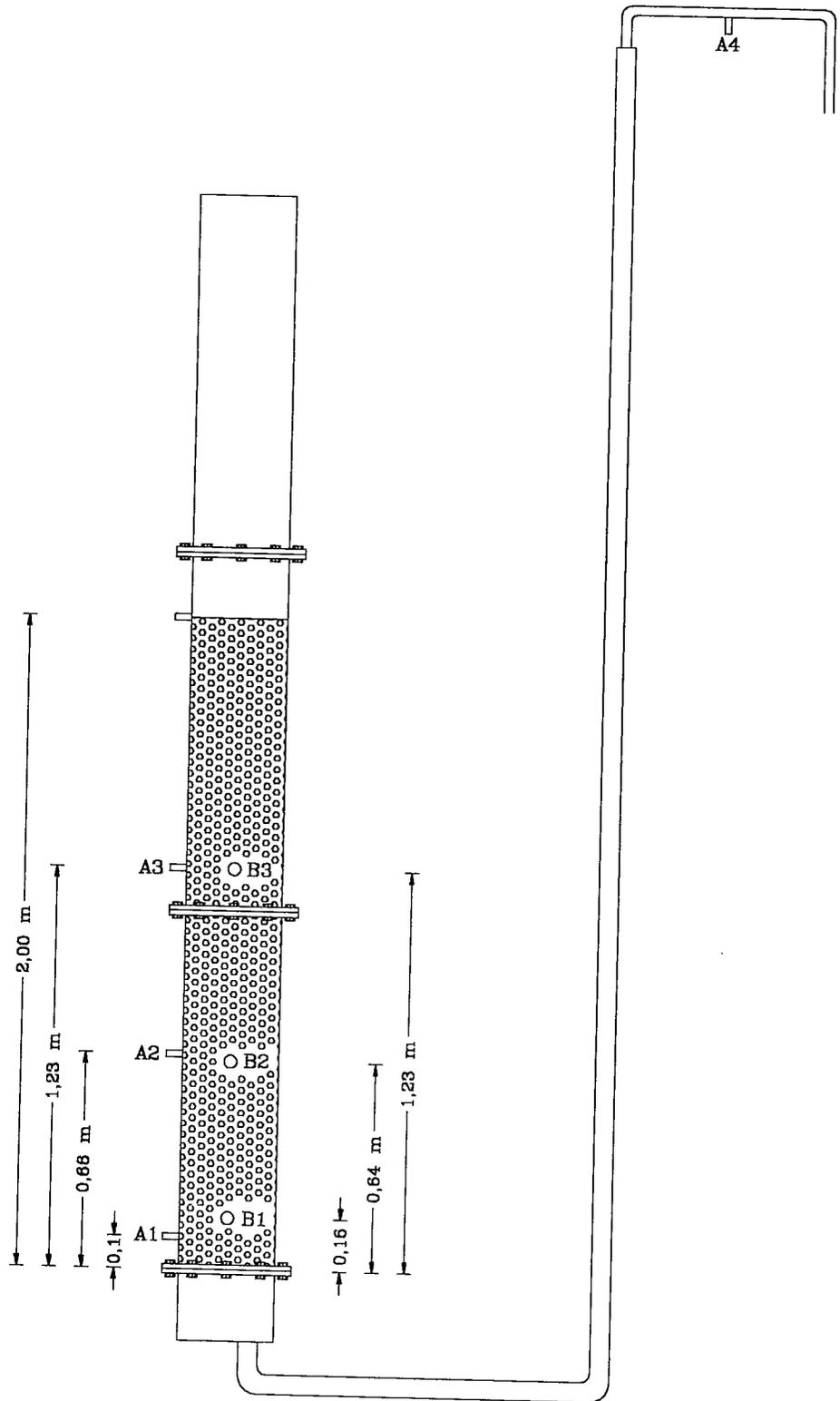


Figura 10. Disposición de los muestreadores en la planta piloto

La salida de agua se situó justo por encima del material de relleno, colocando un sifón para evitar la entrada de gases. Este agua se recogió en un depósito de salida, empleándose como agua de lavado. Tanto la salida como la entrada de agua al sistema estaban controladas por electroválvulas.

Para la eliminación de posibles obstrucciones en la planta piloto, causados principalmente por el crecimiento de la biopelícula, se instaló un sistema de lavado manual, además del automático del sistema, con inyección de agua y aire. Para introducir el agua de lavado se usó una bomba sumergida de 7 m.c.a., regulando el caudal mediante un caudalímetro, siendo este de 60 m<sup>3</sup>/h/m<sup>2</sup>. El aire de lavado se aportó mediante un compresor (ABAKOM® HP-2) de 50 l de capacidad y capaz de proporcionar una presión de 10 Kg/cm<sup>2</sup>. El caudal de aire de lavado se controló igualmente por un caudalímetro y se estableció en 50 m<sup>3</sup>/h/m<sup>2</sup>. Este compresor se encargó también de proporcionar el aire necesario para el accionamiento de las electroválvulas. Tanto el aire como el de agua de lavado se introdujeron a través del falso fondo de la columna.

Los lavados se realizaron de forma manual tras observar excesivas pérdidas de carga en el sistema. Para evitar roturas en el falso fondo de la columna se instaló una válvula de seguridad manual que se abriría si la presión interior excedía de 2 Kg/cm<sup>2</sup>.

El material de relleno empleado fueron arcillas expandidas, con una granulometría que oscilaba entre 2 y 5 mm. Este material tenía una estructura porosa, que le permitía incrementar considerablemente la superficie de contacto y una densidad seca de 1.75 g/cm<sup>3</sup>, por lo que se evitaría que flotase en la superficie.

### **1.3.- INOCULACIÓN DEL SISTEMA PARA LA FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA.**

Debido a que el estudio se realizó sobre agua subterránea contaminada por NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, se hizo preciso, previo a la realización de los ensayos, la formación de una biopelícula responsable del proceso depurador.

Para la formación de esta biopelícula, sobre el material soporte presente en el interior de la columna, se utilizó licor mezcla procedente del reactor de fangos activados de la Estación Depuradora Puente de los Vados (Granada). Este licor mezcla contenía gran cantidad de MLSS ( 3000 ) por lo que permitió una rápida colonización del material de relleno.

Debido a que el contenido en desnitrificantes del licor mezcla de un reactor de fangos activados es bajo, este se enriqueció, en  $\text{NO}_3^-$  así como en la fuente de carbono a ensayar. Dicha mezcla se mantuvo en recirculación durante 7 días, aportándole nuevas cantidades de  $\text{NO}_3^-$  y fuente de carbono de forma diaria. Tras la recirculación se limpió el sistema mediante un ciclo manual de lavado, consistente en el aporte de aire durante 30 segundos y de agua limpia procedente del acuífero durante 1 minuto. Tras la limpieza se comenzó a aportar agua a tratar y fuente de carbono.

Una vez terminada cada fase de la investigación se procedió al lavado intenso del sistema, para eliminar la mayor cantidad posible de biopelícula. Tras esta limpieza se procedió a la formación de una nueva biopelícula en iguales condiciones que para la fase anterior, variando simplemente la fuente de carbono para enriquecerla.

## **2.- ESTUDIO COMPARATIVO DE LA INFLUENCIA DE TRES DIFERENTES FUENTES DE CARBONO EN LA CAPACIDAD DE ELIMINACIÓN DE $\text{NO}_3^-$ MEDIANTE FILTROS SUMERGIDOS.**

### **2,1.- FUENTES DE CARBONO.**

Para abordar este estudio, se seleccionaron una serie de fuentes de carbono, teniendo en cuenta para ello su fácil utilización por microorganismos desnitrificantes, su facilidad para manejarlas y dosificarlas, así como su coste económico.

Tres fueron las fuentes de carbono empleadas en el estudio: Sacarosa (Azucarera de España S.A. Madrid), metanol químicamente puro (Productos Químicos Sevillanos S.A.) y etanol con un 96% de pureza (Productos Químicos Sevillanos S.A.). Estas fuentes de carbono ofrecieron buenos resultados en ensayos previos para desnitrificación (Nurizzo and Mezzanotte, 1992; Akunna et al, 1993; Dahab and Lee, 1992; Hallin et al 1996; Constantin and Fick, 1997) frente a los obtenidos para otras fuentes de carbono como glucosa, melazas, metano etc.

## **2.2.- FUNCIONAMIENTO DE LA PLANTA PILOTO.**

Para abordar el estudio, se mantuvo constante tanto la carga de nitrato como la carga hidráulica, para ello el caudal de trabajo del bombeo de agua a tratar se fijó en 27 l/h y la concentración de  $\text{NO}_3^-$  en la entrada se fijó en 100 mg/l. Durante toda esta fase y el resto de la investigación, el flujo del agua se mantuvo de forma ascendente.

El agua procedente del acuífero de la Vega presentó una concentración variable de  $\text{NO}_3^-$ , que durante la investigación osciló entre 40 y 70 mg/l. Esta concentración se ajustó adicionándole a los 1.7 m<sup>3</sup> contenidos en cada depósito la cantidad estequiométrica necesaria de  $\text{NaNO}_3$  químicamente puro (Sigma<sup>®</sup>), aumentando el valor desde el determinado hasta 100 mg/l aproximadamente.

La adición de la fuente de carbono se realizó mediante dosificación directa en el tubo de agua de entrada. Esta fuente de carbono se introdujo en el sistema previamente diluida en agua destilada y almacenada en el depósito de 30 l. El estudio comparativo se realizó incrementando la concentración de fuente de carbono mediante un aumento del caudal aportado por la dosificadora B. Las dosis variaron desde 0 mg/l hasta valores que permitirían eliminar completamente el N presente en el agua a tratar, estos valores oscilaron en función de la fuente de carbono aportada.

Debido al tamaño de la planta piloto y a su ubicación, la temperatura fue difícil de

controlar, sin embargo y debido a su efecto negativo sobre la desnitrificación, se evitó trabajar en los meses en los que la temperatura del agua fue inferior a 14°C. Los valores de temperatura del agua oscilaron entre 15 y 20 °C.

### **2.3.- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL OXÍGENO.**

Debido al efecto negativo que sobre la actividad desnitrificante ejerce el oxígeno, se realizó el estudio comparativo tanto en ausencia como en presencia de oxígeno. Al margen de esto y con la idea de conocer como afectan diferentes dosis de oxígeno a la capacidad de eliminación de  $\text{NO}_3^-$ , se estudió el comportamiento del filtro biológico manteniendo constante la dosificación de fuente de carbono y variando la concentración de oxígeno.

El agua procedente del acuífero presentó una concentración de oxígeno disuelto de 4.5 mg/l, debido a la turbulencia producida por los sistemas de bombeo. Esta concentración se mantuvo en los denominados procesos con oxígeno y se eliminó para los procesos sin oxígeno mediante la adición de cantidades estequiométricas de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  químicamente puro (Sigma®).

Para estudiar el efecto de diferentes dosis de oxígeno sobre el proceso desarrollado en la planta semi-técnica, las condiciones de trabajo fueron semejantes a las anteriores, pero manteniendo constante la concentración de fuente de carbono. Esta se correspondía con la dosis necesaria para eliminar todo el N en ausencia de oxígeno. Para enriquecer el agua en oxígeno se le provocó turbulencia mediante agitación a su entrada al depósito, logrando unos valores máximos de 7.5 mg/l, igualmente para descenderla se empleó  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ .

Todas las determinaciones de oxígeno se realizaron directamente en la cuba de contención de agua mediante un oxímetro CRISOM® (OXI-350) con autocalibración y compensación de temperatura. Igualmente los ajustes de la concentración de oxígeno se realizaron midiendo en continuo su valor conforme se adicionaba el reductor.

## 2,4.- TOMA DE MUESTRAS

En todos los ensayos se mantuvieron constantes las condiciones de trabajo durante tres días, tomando muestras de agua tanto de entrada y salida con una diferencia de tiempo de 24 h. De este modo se obtenían tres muestreos para cada concentración de fuente de carbono u oxígeno establecida. Tras los tres días se incrementaban las concentraciones.

Para este estudio se tomaron muestras tanto de entrada (justo tras la adición de fuente de carbono) como de salida del lecho biológico, analizándolas para  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  y fuente de carbono. Inmediatamente tras la toma, las muestras se trasladaron al laboratorio y se filtraron a través de filtros bacteriológicos de  $0.45\mu\text{m}$  de tamaño de poro (Millipore<sup>®</sup>, HA). Se evitaba así que la flora bacteriana presente en las muestras pudieran seguir actuando sobre los parámetros a determinar. Para estas filtraciones se empleó un sistema de filtración por vacío (Millipore<sup>®</sup>).

Para cada muestra se filtraron 200 ml separados en dos alícuotas de 100 ml, una para la determinación de aniones o cationes y la otra para la determinación de fuente de carbono. Las muestras se congelaron a  $-20^\circ\text{C}$  y se almacenaron en oscuridad hasta su análisis. Para el almacenaje se emplearon frascos de plástico, opacos, aclarados con agua bidestilada y secos.

Previo al análisis de cada muestra, estas se descongelaron manteniéndolas a temperatura ambiente un tiempo apropiado. Se evitaba así la posible evaporación de las fuentes de carbono de naturaleza alcohólica.

## 2,5.- DETERMINACIÓN DE ANIONES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA IÓNICA.

Las determinaciones de los aniones  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  se realizaron mediante cromatografía iónica siguiendo el proceso empleado por Hijnen et al (1995), así como las indicaciones del *Standar Method for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, AWA and WPLF).

### 2,5,1.- Descripción del Cromatógrafo Iónico.

La cromatografía iónica consiste en la determinación de diferentes iones mediante la retención en el tiempo de estos, en función de la mayor o menor afinidad por una fase estacionaria. Esta separación permite la determinación individual de cada uno de los iones separados en el tiempo.

Para la determinación de los aniones se empleó un cromatógrafo iónico Dionex® DX-300. Dicho cromatógrafo estaba equipado de un sistema para la determinación de aniones y cationes mayoritarios. El sistema de detección de aniones consistía en una columna protectora Ion Pac® A614 de 4mm una columna separadora Ion Pac® A514 de 4 mm y un autosupresor de cationes Ion Pac® Aππ5-II. El equipo estaba dotado igualmente de un detector de conductividad iónica Cdπ, con 11 rangos de sensibilidad (0.01 a 1000  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) un integrador (Dionex® 4400 Integrator) y un muestreador automático (Dionex® Autosampler).

La solución regenerante de aniones fue  $\text{H}_2\text{SO}_4$  36 mN y el eluyente de aniones  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  200mM/  $\text{NaHCO}_3$  75 mM el cual mantenía una línea base de aproximadamente 14.5  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Para el arrastre de regenerante de aniones se empleó una corriente de  $\text{N}_2$  a 6 p.s.i de presión y para el arrastre de la muestra y el eluyente se precisó una corriente de He de 2 p.s.i.

Las señales registradas por el integrador reflejaban las diferentes conductividades, medidas a diferentes tiempos. El propio integrador calculaba las áreas correspondientes a cada pico obtenido. Mediante la comparación de las áreas registradas para cada anión con las detectadas para un patrón, se obtenían las concentraciones.

Mediante un mismo cromatograma se obtenían los valores de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$ , detectándose el  $\text{NO}_2^-$  a un tiempo de retención de 1.6 minutos y el  $\text{NO}_3^-$  a 2.1 minutos. El  $\text{NO}_2^-$  presentaba interferencias con el pico detectado en las muestras para el  $\text{Cl}^-$ , que llegaba a falsear los datos, para evitar este problema las muestras se pasaban a través de un filtro de  $\text{Ag}^+$  que precipitaba el

Cl<sup>-</sup> como AgCl.

### **2,5,2.- Preparación de los patrones.**

Las concentraciones esperadas en las muestras oscilaban entre 0 y 100 mg/l para el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y para valores inferiores en el caso del NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Debido a esto se preparó una solución patrón con 10 mg/l de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y 5 mg/l de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, cuyas áreas obtenidas eran repetitivas trabajando con una sensibilidad en el rango de 1 a 30  $\mu$ S/cm.

Para la preparación de esta solución patrón se elaboraron previamente dos soluciones madres de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NO<sub>2</sub><sup>-</sup> con una concentración de 1 mg/ml. Estos patrones madre se elaboraron con NaNO<sub>3</sub> y NaNO<sub>2</sub> químicamente puros (Panreac<sup>®</sup>) en agua bidestilada.

**NaNO<sub>3</sub>                    1, 3707 g.**

**Agua bidestilada       1000 ml**

**NaNO<sub>2</sub>                    1, 4998 g.**

**Agua bidestilada       1000 ml**

Las soluciones madres se guardaron en frascos de cristal topacio de 100 ml conservándolas a 4°C.

De la solución madre de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> se tomaron 10ml y de la de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 5 ml, enrasando hasta 1000ml. Esta solución patrón se almacenó en la oscuridad y a 4°C.

Previo a cada analítica se empleó el patrón, analizándolo al igual que cada muestra. Cada 10 muestras analizadas se intercaló un patrón, empleando su área para determinar las concentraciones de las diferentes muestras realizadas, así como para conocer cualquier anomalía en el equipo.

### **2,5,3.- Preparación y análisis de las muestras.**

Las muestras perfectamente filtradas y descongeladas se diluyeron en agua bidestilada, ajustando la concentración estimada para el  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  a la del patrón empleado. Las muestras de entrada presentaban una concentración de  $\text{NO}_3^-$  aproximada a 100 mg/l y casi nula para el  $\text{NO}_2^-$  por lo que precisó determinarlas sin diluir para el  $\text{NO}_2^-$  y con una dilución 1/10 para el  $\text{NO}_3^-$ . Las muestras de salida variaban las concentraciones en función del rendimiento del sistema, precisando diferentes ensayos de dilución para determinar correctamente sus valores.

5ml de cada dilución, preparada para cada determinación y por triplicado, se colocaron en unos cartuchos de muestreo especiales para el automuestreador (Dionex®), los cuales presentaban nuevamente un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Conocidas las áreas para cada muestra y obtenido el valor en mg/l por comparación con el patrón, se halló la media y desviación estándar para cada triplicado de la misma muestra. Aquellos valores con una desviación estándar alta se despreciaron volviendo a realizar su determinación.

### **2,6.- DETERMINACIÓN DE $\text{NH}_4^+$**

Para la determinación de  $\text{NH}_4^+$  se optó por un método espectrofotométrico, empleando un espectrofotómetro Hitachi® 2000.

El método empleado fue el de la sal de fenol, basado en la reacción del amoníaco con el hipoclorito y el fenol, catalizada por una sal manganosa, dando como resultado un compuesto azul (indofenol).

Para la determinación se preparó una curva de calibrado, empleando para ello cinco soluciones patrón de  $\text{NH}_4^+$  con 0.1, 0.5, 1, 2 y 3 mg/l. Para la elaboración de estos patrones se preparó una solución madre de 1 mg/ml de la cual se tomaron 0.1, 0.5, 1,2 y 3 ml respectivamente, llevándolos hasta 1000 ml con agua bidestilada.

<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	<b>3.819 g.</b>
<b>Agua Bidestilada</b>	<b>1000 ml</b>

Con los patrones se realizaron las mismas operaciones que con las muestras, obteniendo una curva de calibrado en la cual, por interpolación, se obtenía los valores de concentración para el NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

Para la determinación se tomaron 10 ml de la muestra perfectamente filtrada y descongelada. Sobre esta se adicionaron 0.05 ml de una solución de MnSO<sub>4</sub> (0.003 M) y en agitación se añadieron 0.5 ml de un reactivo de ClO<sup>-</sup> y 0.6 ml del reactivo de la sal de fenato, midiendo la absorbancia a 630 nm.

Previo a la determinación de las muestras se realizó un blanco para ajustar a 0 la absorbancia del espectrofotómetro.

Los reactivos empleados fueron:

a) Reactivo de ácido hipocloroso.

<b>NaOCl (5%)</b>	<b>40 ml</b>
<b>Agua bidestilada</b>	<b>40 ml</b>
<b>pH</b>	<b>6.5-7.0</b>

b) Reactivo sal de fenato.

<b>NaOH</b>	<b>2.5 g</b>
<b>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH</b>	<b>10 g</b>
<b>Agua Bidestilada</b>	<b>100 ml</b>

Al igual que en determinaciones anteriores, se realizaron tres réplicas para cada muestra, determinando el valor medio y la desviación estándar. Cuando esta desviación fue alta se repitió el análisis.

## **2,7.- ANÁLISIS DE FUENTES DE CARBONO.**

### **2,7,1.- Sacarosa.**

Para la determinación de sacarosa se empleó el método espectrofotométrico de Roe y Papadopoulos (1954) utilizando un espectrofotómetro Hitachi® 2000.

Previo a la determinación de las concentraciones de sacarosa, se preparó una curva patrón empleando fructosa. Para dicha curva se prepararon patrones que contenía 0, 10, 30,50, y 70 mg/l de fructosa que se equivalían a 0, 18.55, 55.66, 92.77 y 129.90 mg/l de sacarosa. A cada patrón se le adicionaron iguales reactivos que a las muestras, obteniendo la absorbancia correspondiente a cada concentración. Para cada determinación se realizó una curva de calibrado nueva.

De cada muestra perfectamente filtrada y descongelada, se tomaron 0.5 ml y se le añadieron 0.5 ml del reactivo de Roe y Papadopoulos y 1.5 ml de CIH al 35%. Las muestras así preparadas se incubaron a 80°C durante 13 minutos, se enfriaron y se les determinó la absorbancia a 515 nm. Conjuntamente con las muestras se preparó un blanco empleando 0.5 ml de agua bidestilada en lugar de la muestra. Con este blanco se ajustó el cero del espectrofotómetro.

La composición del reactivo de Roe y Papadopoulos fue:

<b>Resorcinol</b>	<b>0.1 g.</b>
<b>Tiourea</b>	<b>0.25 g.</b>
<b>Ac. Acético glacial</b>	<b>100 ml</b>

Este reactivo se guardó a temperatura ambiente y en frasco topacio que lo resguardó de la luz. Una presencia de color en el reactivo suponía su alteración.

Al igual que para otras determinaciones se realizaron tres réplicas por cada muestra, se determinó su media y desviación estándar, volviendo a analizar aquellas que presentaban una alta desviación estándar.

### **2,7,2.- Determinación de Etanol y Metanol.**

La determinación analítica de estos dos alcoholes se realizó por cromatografía gaseosa empleando un cromatógrafo de gases Perkin Elmer® Autosystem GC. El equipo estaba dotado de una columna de separación SGL 20 de polietilenglicol, con una longitud de 60 metros, un diámetro de 0.53 mm y un espesor de película de 2 $\mu$ m. El detector empleado fue de ionización de llama de H<sub>2</sub> (FID) y se conectó a un integrador Perkin Elmer® LCI 100.

El gas empleado como transportador fue el N<sub>2</sub>, con un flujo de 30ml/min. La temperatura del detector fue de 250°C y el flujo de aire e H<sub>2</sub> fue de 300ml/min y 20 ml/min respectivamente. El inyector se mantuvo a una temperatura de 250°C.

La programación de temperaturas del horno fue, una primera fase con 35°C durante 3 minutos con una rampa de 3°C/min. La segunda fase de temperatura fue de 120° C durante 10 minutos con una rampa de 6°C/min. La temperatura final del horno fue de 200°C.

Para la preparación de rectas de calibración se emplearon soluciones de metanol y etanol químicamente puros (Merck®) en agua bidestilada, obteniendo un rango de concentraciones comprendidas entre 0.25 y 250 mg/l. Como estándar interno se empleó una solución de n-butanol (solución madre de 19.995 g/l). Para cada concentración empleada, se obtuvieron áreas con las que se realizaron las rectas de calibrado.

Sobre 100 ml de la solución problema, previamente termostatada a 20°C, se añadió 1 ml de estándar interno, se agitó y se tomó 1  $\mu$ l mediante una jeringa Hamilton®. Para cada compuesto se obtenía un diferente tiempo de retención, siendo aproximadamente de 3 minutos para el metanol de 4.75 para el etanol y sobre 11.5 minutos para el estándar interno (n-butanol).

### **3.- ESTUDIO COMPARATIVO DEL TAMAÑO Y COMPOSICIÓN DE LA BIOPELÍCULA DESARROLLADA EN EL FILTRO BIOLÓGICO, EMPLEANDO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.**

#### **3.1.- CONDICIONES DE TRABAJO.**

Este estudio se realizó de forma conjunta con el estudio de rendimientos de la planta piloto, lo cual nos permitió comparar los valores de rendimiento del proceso con los obtenidos para la biopelícula. Igualmente se estudió en ausencia de oxígeno y en presencia de este (4.5 mg/l).

#### **3.2.- TOMA DE MUESTRA.**

Las muestras de biopelícula se tomaron una vez formada esta, justo en el comienzo de la adición de fuente de carbono y posteriormente con una periodicidad de 2 semanas, hasta conseguir en la planta la eliminación total del N.

Para la toma de muestra se paró tanto la dosificación de fuente de carbono como la entrada de agua al sistema. Se vació el contenido de agua de la columna por su parte inferior e inmediatamente se tomaron las muestras de relleno. Estas muestras de relleno se tomaron a tres diferentes alturas (16, 63 y 123 cm ). De cada altura se tomaron 5g del relleno, se mezclaron entre ellas, realizando las determinaciones con la mezcla. Todos los ensayos correspondientes a estudios de tipo microbiológico se realizaron a partir de estas muestras.

Inmediatamente tras la toma de muestra se continuó adicionando agua y dosificando fuente de carbono al sistema.

### **3.3.- DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LA BIOPELÍCULA**

El método seleccionado para la determinación del tamaño de la biopelícula fue el análisis del peso seco previa sonicación (Lazarova, et al 1994a). Para esta determinación se hizo preciso extraer la biopelícula adherida al material de relleno y filtrarla para retenerla en un filtro.

Los filtros empleados en el proceso fueron filtros de fibra de vidrio (Schleicher & Schuell®) con un tamaño de poro de 0.45µm. En estos filtros se retenía la práctica totalidad de las bacterias, principal componente de la biopelícula.

Para la extracción de la biopelícula se prepararon erlenmeyer con 100 ml de solución salina (0.9% en NaCl) adicionada de un 1% de tween 80. Con este medio se facilitaba la separación de la biopelícula del material soporte. Sobre estos erlenmeyer se adicionó un gramo de material de relleno y se sonicó durante 5 minutos manteniéndolo posteriormente en agitación (700 r.p.m.) durante 3 horas.

Tras la separación de la biopelícula se eliminó el material de relleno pasándolo a través de una malla de 1mm de luz y aclarando los esquistos con agua bidestilada. El volumen de agua que contenía la biopelícula se filtró a través de un filtro tarado, empleando para ello un sistema de vacío (Millipore®). Los filtros se secaron en una estufa de desecación a 105 °C, se enfriaron en un desecador y se pesaron. La diferencia entre el peso del filtro con la biopelícula y su tara se correspondía con la cantidad de biopelícula formada sobre un gramo de relleno.

Al igual que en el resto de los procesos analíticos, la determinación se realizó por triplicado, repitiendo el análisis si la desviación estándar obtenida era muy alta.

### **3,4.- RECUENTO DE BACTERIAS HETERÓTROFAS CAPACES DE CRECER EN AUSENCIA DE OXÍGENO (HAO).**

Debido a las condiciones de trabajo ( adición de fuente de carbono, limitación de oxígeno y presencia de  $\text{NO}_3^-$  ) las bacterias que principalmente se desarrollaron en la biopelícula fueron heterótrofos capaces de crecer en ausencia de oxígeno. Dentro de este amplio grupo se encuentran bacterias capaces de emplear el  $\text{NO}_3^-$  bien por vía asimilatoria como desasimilatoria.

Para el recuento de bacterias se empleó el método de recuento en placa. El medio de cultivo empleado debía contener una fuente de carbono y  $\text{NO}_3^-$ , así como otros nutrientes, de modo que no se limitase el crecimiento de las bacterias. El medio empleado fue el agar-sacarosa-nitrato (Rodina, 1972) adicionado de extracto de levadura.

<b>Na NO<sub>3</sub></b>	<b>2 g.</b>
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	<b>1 g.</b>
<b>MgSO<sub>4</sub> X 7H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.5 g.</b>
<b>KCl</b>	<b>0.5 g.</b>
<b>FeSO<sub>4</sub> X 7H<sub>2</sub>O</b>	<b>tr.</b>
<b>Sacarosa</b>	<b>30 g.</b>
<b>Ext. Levadura</b>	<b>1 g.</b>
<b>Agar</b>	<b>20 g.</b>
<b>Agua destilada</b>	<b>1000 ml</b>

El pH se ajustó a 7.0 empleando ClH 1N. El medio así preparado se esterilizó en autoclave de vapor a 112 °C durante 30 minutos y se vertió en placas Petri estériles.

Para los recuentos se separó la biopelícula del material de relleno de igual modo que en el caso anterior, pero sin emplear sonicación. El proceso debía de ser más suave ya que se precisaba no alterar la viabilidad de las bacterias. En este caso se emplearon 100 ml de solución

salina (0.9% ClNa) estériles sobre los cuales se añadió un gramo de relleno. Tras la agitación (700 r.p.m.) no se separaron los esquistos y sobre la suspensión bacteriana empleada se realizaron los recuentos.

Debido a la alta concentración bacteriana esperada, por gramo de relleno, se precisó realizar diluciones, previo al cultivo. Para estas diluciones se emplearon tubos de ensayo con 9 ml de solución salina estéril (0.9 % ClNa) haciendo diluciones seriadas hasta valores de  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ . De estas diluciones se sembraron 0.1 ml en placas Petri mediante una espátula de Diglasky y se incubaron en anaerobiosis.

Para la incubación en anaerobiosis se empleó el sistema Anaerogen<sup>®</sup> (OXOID). Las placas se introdujeron en una campana de anaerobios de 3.5 l de capacidad, equipada de catalizador de temperatura baja. Al interior de la jarra se introdujo un sobre de Anaerogen<sup>®</sup> y un indicador de anaerobiosis, cerrándola inmediatamente y asegurándonos que todas las válvulas estaban correctamente cerradas. Este sistema, que emplea ácido ascórbico como principio activo, eliminaba el oxígeno del interior, virando en este punto el indicador de anaerobiosis del color rosaceo a incoloro.

Una vez conseguida la anaerobiosis la campana se incubó en la oscuridad a  $30 \pm 2$  °C durante un período de tres semanas. Tras este tiempo la campana se abrió y se contaron todas las colonias crecidas en las placas, con la ayuda de un contador de colonias (COMECTA S.A.), dotado de lupa de aumento y contador digital por contacto.

Se analizaron a la vez tres rellenos diferentes. Para cada muestra se ensayaron dos diluciones diferentes, contando los valores de aquellas que presentaban mayor facilidad en el recuento (menos de 200 ufc). Para cada recuento se calculó la media y su desviación estandar, despreciando los recuentos con alta desviación estandar.

### **3,5.- RECUENTO DE BACTERIAS DESNITRIFICANTES.**

Dentro del grupo bacteriano anteriormente determinado, se encontraban las bacterias desnitrificantes, que en su mayoría son heterótrofos aerobios, pero capaces de utilizar el  $\text{NO}_3^-$  en ausencia de oxígeno. Para determinar estas bacterias, dentro de las presentes en las placas anteriores, se observaron todas las diferentes morfologías coloniales, se anotó el número de cada una de ellas, obtenido en cada placa y se sembraron tres cepas de cada morfología en un medio de cultivo con la idea de conocer su posible actividad desnitrificante.

El medio de cultivo empleado en este ensayo fue semejante al usado en la determinación anterior, pero se descendió su concentración en agar a 6 g/l, obteniendo así un medio semisólido. Una vez suspendido el agar, se calentó a  $100^\circ\text{C}$  para fundirlo y se vertió en tubos de hemólisis a razón de 3ml por tubo. El medio se esterilizó mediante autoclave de vapor a  $112^\circ\text{C}$  durante 30 minutos.

Previo al cultivo del medio, este se regeneró. Para ello se calentó al baño maría, licuando el medio, durante 2 minutos. Una vez licuado se enfrió de modo brusco, consiguiendo una rápida solidificación. De este modo se eliminaba gran parte del oxígeno disuelto presente en el medio, debido a su calentamiento y rápido enfriamiento, que evitaría nuevas disoluciones de oxígeno. Tras la solidificación se inoculó por picadura y se selló con parafina líquida estéril. Este medio se incubó en la oscuridad a  $30\pm 2^\circ\text{C}$  durante 7 días.

Para conocer si las cepas bacterianas correspondientes a cada morfología, eran desnitrificantes, los tubos inoculados se observaron cada 24 h. Para estas condiciones de cultivo, las cepas desnitrificantes producían abundante  $\text{N}_2$  a partir del  $\text{NO}_3^-$  presente en el medio de cultivo, por lo cual aquellos tubos que manifestaban rotura del medio, por producción de gas, se consideraron positivos. La prueba se repitió para tres cepas diferentes de la misma morfología, asegurando de este modo que la producción de gas se debía a su actividad desnitrificante.

Los valores de desnitrificantes fueron los recuentos obtenidos en el ensayo anterior para las morfologías consideradas como positivas en producción de  $N_2$  a partir de  $NO_3^-$ .

### **3.6.- RECUENTO DE REDUCTORES DE NITRATO.**

Al igual que los desnitrificantes, dentro de las cepas presentes entre los heterótrofos capaces de crecer sin oxígeno, también se encontraban cepas capaces de reducir desasimilatoriamente el  $NO_3^-$ , transformándolo en  $NO_2^-$ . Para conocer su número, se ensayó esta capacidad del mismo modo que se realizó para los desnitrificantes, empleando en este caso la técnica descrita por Mac Faddin (1976). El medio de cultivo empleado para esta determinación fue:

<b>Peptona</b>	<b>5 g.</b>
<b>Extracto de carne</b>	<b>3 g.</b>
<b><math>NO_3K</math></b>	<b>1 g.</b>
<b>Agua Destilada</b>	<b>1000 ml</b>

Al medio se le ajustó el pH a 7.2 empleando ClH 1N, se repartió en tubos de hemolisis a razón de 2 ml por tubo y se esterilizó en autoclave a  $112^\circ C$  durante 30 minutos.

Los tubos se inocularon por triplicado, igualmente con tres cepas diferentes para cada morfología. Se incubaron en oscuridad a  $30 \pm 2^\circ C$  durante 48 h procediendo a su lectura.

En la lectura de los tubos se determinó si en ellos aparecía  $NO_2^-$ . Para ello se adicionaron dos reactivos que contenían ácido sulfanílico y N-N dimetil - 1- naftilamina en ácido acético 5N (0,8 g/100ml y 0,6 g/100ml respectivamente) que dan color rojo en presencia de  $NO_2^-$ . Las cepas que dieron positiva esta prueba se consideraron como reductoras de nitrato y se tomó como recuento el valor obtenido para cada morfología.

### **3.7.- CONSERVACIÓN DE CEPAS DESNITRIFICANTES.**

Las diferentes cepas consideradas desnitrificantes se conservaron para su posterior identificación y determinación de su actividad desnitrificante. Para esta conservación se empleó la liofilización.

Para liofilizar las cepas se empleó un medio nutritivo, Trypticasa-soja-agar (TSA, Difco®), preparado en tubos de forma inclinada. Para la preparación del medio, se resuspendió en agua el preparado comercial (40 g/l), se calentó a 100°C para fundir el agar que contenía y se repartió en tubos a razón de 5ml por tubo. El medio así preparado se esterilizó en autoclave a 112°C durante 30 minutos. Antes de que solidificara, el tubo se dispuso inclinado con un ángulo de 30°, consiguiendo así que solidificara de forma inclinada. Sobre este medio de cultivo se sembraron las diferentes cepas, incubándolas en oscuridad a 30±2°C durante 18 h. De este modo se obtenía un cultivo puro en fase exponencial de crecimiento.

Para la liofilización se precisó un crioprotector, empleando en este caso un medio de cultivo a base de leche desnatada (Difco®). Este medio se preparó resuspendiendo el preparado comercial en agua (76 g/l) y repartiéndolo a razón de 4 ml por tubo. Se esterilizó al autoclave a 112°C durante 15 minutos y evitando posteriores recalentamientos, debido a su posible caramelización.

En cada uno de los tubos donde creció el cultivo en fase exponencial, se vertieron los 4 ml de leche desnatada. Con una pipeta estéril se resuspendió el cultivo en la leche desnatada, ayudándonos igualmente de agitación. Una vez suspendido el cultivo se dispusieron 0.7 ml de leche desnatada en viales estériles y se cerraron con tapones de goma estériles.

Los viales con la leche desnatada se congelaron durante toda la noche a - 20°C y posteriormente se liofilizaron en un liofilizador (LABCOMCO), empleando -43°C y alto vacío durante 24 h. Tras cerrar los viales dentro del propio liofilizador, se sellaron con una tapa de

aluminio y se conservaron a 4°C en la oscuridad.

Para la recuperación del cultivo se preparó un medio nutritivo, Caldo de Tripticasa-soja (TSB, Difco®) esterilizándolo en autoclave a 102°C durante 30 minutos. Se añadió a los viales empleando jeringuilla y aguja estériles, se resuspendió el liofilizado y se añadió a tubos que contenían igual medio de cultivo, incubándolo a 30±2°C en oscuridad durante 48 h. Una vez crecidas las cepas, se aislaron en Placas Petri que contenían T.S.A. (Difco®), obteniendo nuevamente un cultivo puro.

#### **4.- CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA Y DE LA ACTIVIDAD DE LOS MICROORGANISMOS DESNITRIFICANTES AISLADOS DE LA BIOPELÍCULA.**

##### **4.1.- IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS CEPAS DESNITRIFICANTES AISLADAS.**

Todas las cepas aisladas se identificaron como bacilos Gram-negativos, por lo que para su determinación a nivel de especie se empleó una serie de pruebas bioquímicas realizadas mediante kits de identificación para no enterobacterias API 20NE (BioMerieux S.A., Marcy l'Etoile, Francia).

Mediante esta galería se obtuvo información sobre la asimilación de fuentes de carbono por parte de las cepas, concretamente: Glucosa, Arabinosa, Manosa, Manitol, N-acetil-glucosamina, Maltosa, Gluconato, Caprato, Adipato, Malato, Citrato y Fenil-acetato. Conjuntamente con estas pruebas se obtuvo información sobre la posibilidad de formación de indol desde triptófano, la fermentación de glucosa y la presencia de enzimas como Arginina dihidrolasa, Ureasa, β-glucosidasa, proteasa y β-galactosidasa.

Para algunas cepas bastó con estas pruebas para conocer su especie, pero en la mayoría

de los casos no fue suficiente, precisando realizar algunas pruebas complementarias. La selección de las pruebas se realizó a través de las indicaciones de Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1974). Las pruebas seleccionadas son las siguientes:

#### **4,1,1.-Determinación de la presencia de la enzima Citocromo Oxidasa.**

Esta enzima responsable de los procesos oxidativos de las bacterias, está íntimamente relacionada con la cadena de transporte de electrones que interviene en los procesos de desnitrificación. Para su determinación se empleó un reactivo fácilmente oxidable como el Tetrametil-p-fenilén diamina (Sigma<sup>®</sup>), con una concentración de 1 g/l en agua destilada, que en contacto con la masa bacteriana y en presencia de la enzima, viraba inmediatamente de incoloro a color azul intenso.

#### **4,1,2.- Determinación de la producción de Fluoresceína.**

Algunas cepas desnitrificantes, concretamente algunas especies del género *Pseudomonas* producen fluoresceína, siendo esto característico de estas especies, que en algunas ocasiones es dificultoso determinarla por medio del kit comercial. Para su determinación se hizo crecer en el medio KING B (Difco<sup>®</sup>).

<b>Proteasa-peptona</b>	<b>20 g.</b>
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	<b>1.5 g.</b>
<b>K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>X3H<sub>2</sub>O</b>	<b>1.8 g.</b>
<b>Agar-agar</b>	<b>10 g.</b>
<b>Glicerina</b>	<b>10 g.</b>
<b>Agua destilada</b>	<b>1000 ml</b>

Para prepararlo, se resuspendió en agua, se calentó a 100°C para fundir el agar, se repartió en tubos (5 ml/tubo) y se esterilizó al autoclave a 112°C durante 30 minutos. El medio se dejó

enfriar en forma inclinada, se sembró abundantemente con la cepa problema y se incubó en la oscuridad a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Las cepas que presentaron color amarillo-verdoso fluorescente se consideraron positivas.

#### **4,1,3.- Producción de Poli- $\beta$ -Hidroxibutirato (PHB).**

Muchas cepas desnitrificantes acumulan PHB, siendo esto determinativo para su identificación.

Para su determinación se realizó una coloración con sudán negro (0.3% en alcohol de 60%), sobre un cultivo fijado en un portaobjetos, durante 10 minutos y tras lavarlo, se añadió safranina durante 10 segundos como colorante de contraste (Murray, 1981). La tinción se observó al microscopio óptico (1000X), empleando aceite de inmersión. Las células que presentaban gránulos internos de color azul oscuro con citoplasma de color rosáceo se consideraron positivas.

#### **4,1,4.- Crecimiento a $40^{\circ}\text{C}$ .**

La mayoría de las cepas desnitrificantes del género *Pseudomonas* son capaces de crecer a  $40^{\circ}\text{C}$  a excepción de unas pocas especies, siendo esto factor diferenciador del resto.

Para la realización de la prueba, se preparó T.S.A. (Difco®) en placas Petri y se sembró incubándolos en oscuridad a  $40^{\circ}\text{C}$  durante 48 h. Las cepas que manifestaron crecimiento se consideraron como positivas.

#### **4,1,5.- Hidrólisis del almidón.**

La capacidad para hidrolizar el almidón es característico de ciertas especies de bacilos Gram-negativos desnitrificantes, por lo que esta prueba acerca más la identificación taxonómica de estas cepas.

Para esta prueba se empleó el medio de cultivo Bacto-Almidón-Agar (Difco®). Para su preparación se resuspendió el preparado comercial en agua (25 g/l) y se esterilizó al autoclave a 121°C durante 15 minutos vertiéndolo posteriormente en placas Petri.

<b>Extracto de carne</b>	<b>3 g.</b>
<b>Almidón soluble</b>	<b>10 g.</b>
<b>Agar</b>	<b>12 g.</b>
<b>Agua Destilada</b>	<b>1000 ml</b>

Una vez sembrada la placa con la cepa problema se incubó en la oscuridad a 30±2°C durante 48 h. Tras la incubación se le añadió una solución de iodo sobre el medio de cultivo, considerando positivas aquellas cepas que presentaban a su alrededor un halo de coloración más clara que el color púrpura del resto de la placa.

#### **4,1,6.- Empleo de fuentes de carbono.**

Como complemento a las fuentes de carbono ensayadas en el Kits comercial y siguiendo los pasos marcados para la diferenciación de cepas desnitrificantes del género *Pseudomonas* del manual Bergey's, se empleó D-xylosa, etilén glicol, 2,3 butilén glicol, geraniol, levulinato, glicolato, l-histidina, betaina, y sarcosina.

El medio de cultivo empleado para esta determinación fue el modificado de Grahan y Parker (1964), un medio sobre el cual se añadió un 1% de la fuente de carbono a ensayar.

Tras disolver todos los compuestos del medio, se ajustó el pH a 7.0 empleando ClH 0,1N. El medio se añadió a tubos estériles a razón de 5 ml/tubo. Para esterilizarlo se filtró a través de filtros de celulosa de 0,22 µm de tamaño de poro, empleando un dispositivo Swinex (Millipore®). Los tubos se inocularon con un cultivo crecido tras 18 h en TSA (Difco®) y se incubó en la oscuridad a 30±2°C durante 48 h. Las cepas que dieron turbidez al medio se consideraron

positivas.

**Tabla 2. Medio de cultivo modificado de Grahan y Parker.**

<b>MgSO<sub>4</sub> X 7H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.25 g.</b>
<b>CaCl<sub>2</sub> X 2H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.025 g.</b>
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> X7H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.9 g.</b>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>0.55 g.</b>
<b>NaCl</b>	<b>0,25 g.</b>
<b>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> X6H<sub>2</sub>O</b>	<b>4 mg.</b>
<b>ZnSO<sub>4</sub> X 7H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.16 mg.</b>
<b>CuSO<sub>4</sub> X 5H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.08 mg.</b>
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	<b>0.5 mg.</b>
<b>MnSO<sub>4</sub> X H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.4 mg.</b>
<b>PO<sub>4</sub>NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub></b>	<b>0.5 g.</b>
<b>Extracto de levadura</b>	<b>tr.</b>
<b>Fuente de carbono</b>	<b>10 g.</b>
<b>Agua destilada</b>	<b>1000 ml</b>

Con todas las pruebas realizadas, junto con las observaciones coloniales (pigmentos y morfología colonial) y siguiendo las indicaciones del Manual Bergey's de taxonomía, para bacilos y cocos Gram-negativos se llegó a la identificación a nivel de especie.

#### **4,2.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DESNITRIFICANTE DE LAS CEPAS AISLADAS.**

Para el estudio de la actividad desnitrificante se determinó la producción de N<sub>2</sub>O a partir de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, empleando el método de inhibición del acetileno descrito por Yoshinari y Knowles (1976). El método consistió en hacer crecer la cepa en un medio herméticamente cerrado con una atmósfera inerte que no contenía oxígeno. La concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> era conocida y se medía el

N<sub>2</sub>O producido tras inhibir la actividad enzimática de la óxido nitroso reductasa con acetileno. Este método fue ampliamente empleado para este fin (Probanza et al, 1996; Bengtsson and Beergwall, 1995; Lohse, et al, 1996; Almeida et al, 1995).

#### **4,2,1.- Preparación del medio de cultivo.**

El medio de cultivo empleado para esta prueba fue un modificado del Nitrato-Sacarosa descrito por Rodina (1972). Para esta prueba se aumentó la concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y se descendió la de la fuente de carbono, lo cual permitiría una mayor formación de N<sub>2</sub>O y menor de CO<sub>2</sub>, facilitando así la posterior determinación del N<sub>2</sub>O. El medio empleado fue:

<b>Na NO<sub>3</sub></b>	<b>3 g.</b>
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	<b>1 g.</b>
<b>MgSO<sub>4</sub> X 7H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.5 g.</b>
<b>Kcl</b>	<b>0.5 g.</b>
<b>FeSO<sub>4</sub> X 7H<sub>2</sub>O</b>	<b>tr.</b>
<b>Sacarosa</b>	<b>2 g.</b>
<b>Agua destilada</b>	<b>1000 ml</b>

Al medio se le ajustó el pH a 7.2 empleando ClH 0.1 N. Una vez preparado se añadió en tubos estériles de tapón de rosca y sellados con silicona de 3 mm de espesor, a través de un sistema Swinex (Millipore®) con filtro de celulosa de 0,22 µm.

Para eliminar el oxígeno del interior del tubo se recirculó durante 10 minutos Helio 5.0 (Abelló Linde S.A.) empleando una aguja de 15 cm pinchada a través de la silicona y conectada a un dispositivo Swinex (Millipore®) con filtro de celulosa de 0,22 µm. De este modo se conseguía esterilizar el aire que se recirculaba a la vez que se mantenía un burbujeo en el medio de cultivo, facilitando así la eliminación del oxígeno disuelto. Como salida de aire se empleó una

aguja de 5 cm igualmente pinchada a través de la silicona.

#### **4,2,2.- Inoculación.**

La cepa a ensayar se hizo crecer en el mismo medio de cultivo empleado en la prueba, pero adicionado de un 0.1% de extracto de levadura y agar para solidificarlo. La cepa se sembró en este medio y se hizo crecer en la oscuridad a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 18 h, consiguiendo así un cultivo en fase exponencial. Tras el crecimiento se realizó una suspensión bacteriana en solución salina estéril (0.9%), equivalente al 0.5 de la escala de Mc Farland y se inoculó el tubo anterior con 0.25 ml de esta suspensión, empleando para ello jeringuillas estériles.

Justo tras la inoculación se eliminó el 10% de la atmósfera interior del tubo y se repuso con acetileno puro. Para ello se emplearon igualmente jeringuillas estériles.

Los tubos de cultivo así preparados se incubaron en la oscuridad a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas. Para cada hora se prepararon tres réplicas, resultando un total de 18 tubos más un tubo  $t_0$  para cada cepa.

#### **4,2,3.- Determinación del $\text{N}_2\text{O}$ .**

Para la determinación del  $\text{N}_2\text{O}$  se empleó un Cromatógrafo de gases Varian<sup>®</sup> Star 3400 CX, equipado de un horno universal para termostatación de los inyectores, inyector "On Colum" para columnas empaquetadas (1040), columna empacada Porapak<sup>®</sup>N 1/8" SS de 2 metros de longitud, detector de conductividad térmica (TCD) y línea auxiliar de gas de referencia para TCD. El equipo estaba conectado a un integrador /registrator incorporado IBDH.

Como condiciones de trabajo se mantuvieron, la temperatura del inyector en  $150^{\circ}\text{C}$ , debido a que las muestras a analizar eran gaseosas. La temperatura del horno fue de  $50^{\circ}\text{C}$  y la detector de  $150^{\circ}\text{C}$ . El gas de arrastre fue el He con una presión de 14 p.s.i.

Las muestras de gas de los tubos en incubación se tomaron, tras el tiempo correspondiente, pinchando con una jeringa con aguja de 0.33 x 13 mm (Becton Dickinson®) a través de la silicona e inmediatamente se pincharon (250 µl) en el cromatógrafo a través de un "septun" de teflón (3/8 "). Las muestras se arrastraron por el He a través de la columna empacada, separando los gases en función de la afinidad de estos por el relleno. El detector enviaba una señal al integrador, el cual la registraba en forma de áreas. El pico del N<sub>2</sub>O se registraba a 3.2 minutos de tiempo de retención, dando un área que se comparaba con la obtenida para un patrón. Sobre 7 minutos se registró el pico del acetileno el cual nos indicaba si dentro del tubo se mantenía la concentración del 10%, desechando los tubos que no la registraban.

Para la preparación del patrón se pinchó 1 ml de N<sub>2</sub>O purísimo (Abelló Linde S.A.) en un tubo de 10 ml cerrado herméticamente. El tubo estaba lleno de aire y previo a la incorporación del N<sub>2</sub>O se extrajo 1 ml de este. Con esta mezcla se conseguía un patrón de 4464 µmoles/l del cual se pinchó en iguales condiciones de trabajo 250 µl en el cromatógrafo de gases.

#### **4.2,3.- Recuento de bacterias por tubo.**

La actividad desnitrificante se expresó como µmoles de N<sub>2</sub>O producidos por unidad bacteriana y por horas. Para esto se precisaba conocer la cantidad de bacterias presentes en el tubo en el momento de la medida. La técnica empleada fue el recuento directo en placa.

El medio de cultivo empleado fue el descrito anteriormente para los recuentos de heterótrofos capaces de crecer sin oxígeno, preparado de igual modo. Debido a la alta concentración bacteriana desarrollada en el tubo se prepararon previamente diluciones en solución salina estéril (0.9%). Las diluciones empleadas fueron 10<sup>-7</sup> y 10<sup>-8</sup> realizando tres recuentos en placa Petri para cada dilución. Aquellas placas que presentaron recuentos posibles de contar se emplearon para obtener el resultado. La siembra en placas se hizo mediante espátula de Diglasky al igual que en recuentos anteriores.

Tras obtener el valor del recuento, ayudándonos de un contador de colonias (COMECTA S.A.), se calculó la media y desviación estándar para cada determinación, despreciando los valores con alta desviación estándar y repitiendo el análisis.

Los valores de  $N_2O$  obtenidos en  $\mu\text{moles/l}$  se transformaron en  $\mu\text{moles}$ , al conocer el volumen de todos los tubos empleados en el ensayo. Conocido el número total de bacterias por tubo se calculó la actividad en  $\mu\text{moles/bacteria}$  por unidad de tiempo.

## **5.- INFLUENCIA DE LA CARGA DE $NO_3^-$ EN LA CAPACIDAD DE ELIMINACIÓN DE NITRÓGENO POR EL FILTRO INUNDADO ASÍ COMO EN LA COMPOSICIÓN DE LA BIOPELÍCULA.**

Para conocer como afectaba la carga al rendimiento en la eliminación de nitrógeno así como al tamaño de la biopelícula y su composición de microorganismos, relacionados con esta eliminación, se planteó esta fase del trabajo en la que se mantenían constantes todos los parámetros a excepción de la concentración de  $NO_3^-$ .

Este estudio se realizó con una sola fuente de carbono, seleccionándose en este caso el etanol. El caudal de agua de entrada se fijó en 27 l/h y se eliminó por completo el oxígeno disuelto en el agua.

Las diferentes cargas de nitrato ensayadas se variaron en función del  $NO_3^-$  disuelto en el agua de entrada, oscilando este entre 50 mg/l y 300 mg/l. La fuente de carbono adicionada fue la necesaria para eliminar la máxima cantidad posible de  $NO_3^-$ , variándose esta el función del caudal aportado por la dosificadora B.

Los muestreos fueron semejantes al los realizados en la fase anterior, con la salvedad de que las muestras de agua se tomaron de entrada, salida y a tres diferentes alturas ( 10, 66 y 123 cm). Los muestreos de relleno se tomaron tras 2 semanas desde la formación de la biopelícula,

para cada carga de nitrato ensayada. En este caso las muestras tomadas a diferentes alturas se analizaron por separado sin mezclarse.

Para las muestras de agua se analizaron las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  y fuente de carbono, observando su variación a lo largo de la columna. Para las muestras de relleno se analizó el tamaño de la biopelícula, la composición en heterótrofos capaces de crecer sin oxígeno, desnitrificantes y reductores de nitrato. Las técnicas analíticas han sido descritas anteriormente.

## **6.- INFLUENCIA DEL CAUDAL DE AGUA DE ENTRADA EN LA CAPACIDAD DE ELIMINACIÓN DE NITRÓGENO POR EL FILTRO INUNDADO Y SUS EFECTOS EN LA COMPOSICIÓN DE LA BIOPELÍCULA.**

Al igual que en el estudio anterior se estudió los posibles efectos que sobre el rendimiento del sistema y la composición de la biopelícula tenía la variación del caudal. Con esta variación no solo se variaba la carga de  $\text{NO}_3^-$ , sino también la carga hidráulica y el tiempo de retención. Con estos resultados se obtenían parámetros orientativos para obtener los de diseño del sistema.

Las condiciones de trabajo así como los muestreos y las técnicas analíticas, fueron semejantes a las de la anterior fase, pero fijando el  $\text{NO}_3^-$  de entrada en 100 mg/l y variando el caudal desde 13.8 l/h hasta 54 l/h.

## **7.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Todos los datos obtenidos en la fase experimental se sometieron a tratamiento estadístico asistido por ordenador. Los tratamientos estadísticos realizados consistieron en:

- Ajustes lineales para comparar los diferentes rendimientos según fuente de carbono e

influencia del oxígeno. Igualmente se aplicó a los crecimiento de la biopelícula, así como en la variación en la composición de la biopelícula.

- Coeficientes de Pearson de correlación lineal entre las diferentes variables empleadas en los ensayos.
  
- Análisis de la Varianza (ANOVA) de una vía o multifactorial.
  
- Test de Mínimas Diferencias Significativas (LSD) entre medias y test de rango múltiple (t de Student) para la comparación por separado de las fuentes de variación en los análisis multifactor.

Para todos los casos se consideró el 95% ( $p < 0.05$ ) como nivel de significancia.

Todos los resultados se presentaron en gráficas comparativas o bien en tablas representativas, en función del análisis estadístico realizado.

Para este tratamiento se empleó el paquete informático STATGRAPHICS® Versión 5.0 (STSC Inc., Rockville, Maryland, USA 1989) con licencia N° 10624, propiedad de la universidad de Granada.



## **IV.- Resultados.**

---



## **1.- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA FUENTE DE CARBONO.**

El objetivo de esta fase de la investigación fue comparar la capacidad de eliminación de nitrógeno del sistema de filtros sumergidos, empleando tres diferentes fuentes de carbono, previamente seleccionadas (sacarosa, metanol y etanol). Para ello se mantuvo constante la concentración de  $\text{NO}_3^-$  en el agua de entrada, siendo esta de 100 mg/l y se dosificaron concentraciones crecientes de fuente de carbono hasta obtener un agua de salida sin compuestos de nitrógeno.

Para evitar la influencia del oxígeno en la actividad depuradora del sistema se eliminó por completo el oxígeno disuelto en el agua a tratar, adicionando cantidades estequiométricas de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ .

### **1,1.- SACAROSA**

Los valores de eliminación de nitrógeno obtenidos, empleando sacarosa como fuente de carbono, presentaban diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ), para cada concentración de fuente de carbono adicionada. Se observó una relación directa entre la concentración de sacarosa adicionada y la cantidad de nitrógeno eliminada del agua tratada, ajustándose los datos a una regresión lineal tal como se aprecia en la tabla 3.

El valor del nitrógeno eliminado en el origen, deducido del ajuste lineal, fue mayor que el obtenido para los ensayos realizados con las otras dos fuentes de carbono. Sin embargo la pendiente de la recta obtenida en el ajuste lineal fue la menor de los tres ensayos, lo cual indicaba que para eliminar la misma cantidad de nitrógeno del agua a tratar, se precisaban mayores dosificaciones de fuente de carbono.

La figura 11 representa el ajuste lineal que se obtenía para este ensayo. Por interpolación

en dicha representación gráfica, se obtenía la concentración de sacarosa necesaria para eliminar los 100 mg/l de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> presentes en el agua contaminada, dicho valor fue de 133.35 mg/l, obteniendo una relación de 1.33 unidades de sacarosa para eliminar una unidad de nitrato. Esta relación descendía un 27% (0.97) si la interpolación se realizaba para eliminar solo la mitad del nitrógeno presente en el agua de entrada (11.29 mg/l).

**Tabla 3.- Ajuste lineal obtenido para los ensayos con sacarosa en ausencia de O.D.**

<b>Ajuste lineal <math>y = a + bx</math></b>				
Variable dependiente: N eliminado				
Variable independiente: Sacarosa adicionada				
<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>T-estadística</b>	<b>P-valor</b>
<b>Ord. Origen</b>	4.81695	0.220054	21.8899	< 0.001
<b>Pendiente</b>	0.133206	0.00265591	50.1545	< 0,001
<b>Coefficiente de correlación:</b> 0.988283		<b>r<sup>2</sup>:</b> 97.67 %		
<b>Error estándar de la estimación:</b> 0.816638				

Las concentraciones de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NO<sub>2</sub><sup>-</sup> que se observaban en el agua de salida, en función de la concentración de sacarosa adicionada (figura 12) variaban de forma diferente, conforme se aumentaba esta. La concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> seguía una tendencia descendente, conforme se incrementaba la dosificación de fuente de carbono, hasta llegar a desaparecer. Por lo contrario, el NO<sub>2</sub><sup>-</sup> seguía una tendencia ascendente hasta una concentración media máxima de 5.5±0.5 mg/l, para una dosificación de 59 mg/l de sacarosa, descendiendo posteriormente hasta eliminarse por completo. Esta máxima concentración de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> se alcanzaba cuando el sistema presentaba un rendimiento del 54% en eliminación de nitrógeno del agua a tratar. Hay que indicar que la concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el agua de salida, sin adición de sacarosa, fue inferior que la obtenida para pequeñas concentraciones de la fuente de carbono, lográndose un rendimiento de casi el 30% en este punto inicial del ensayo.

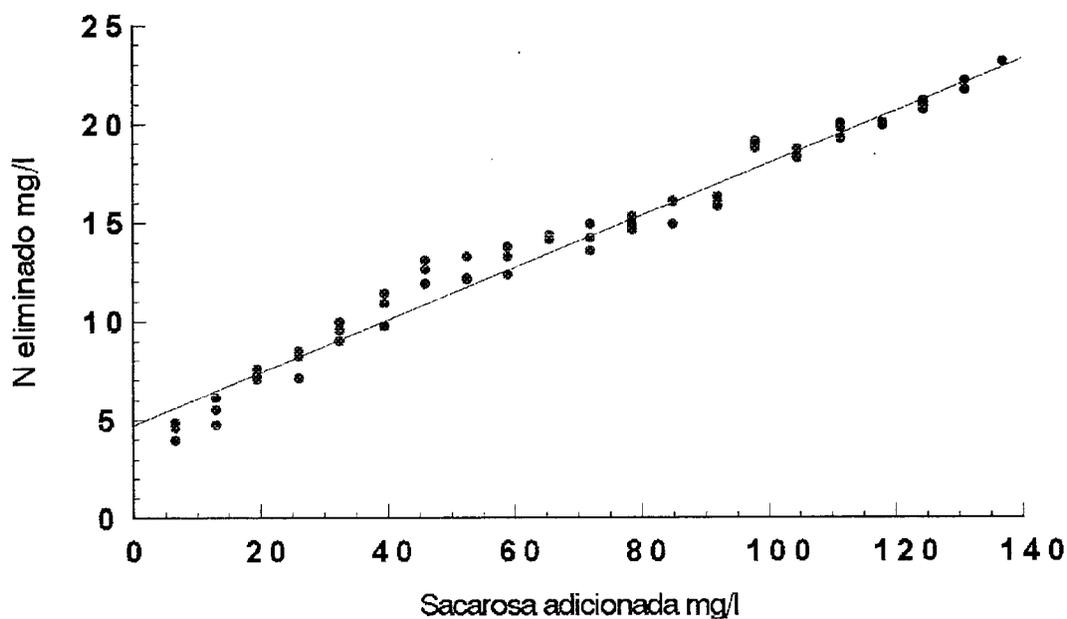


Figura 11. Ajuste lineal entre sacarosa adicionada y nitrógeno eliminado. Ensayo sin O.D.

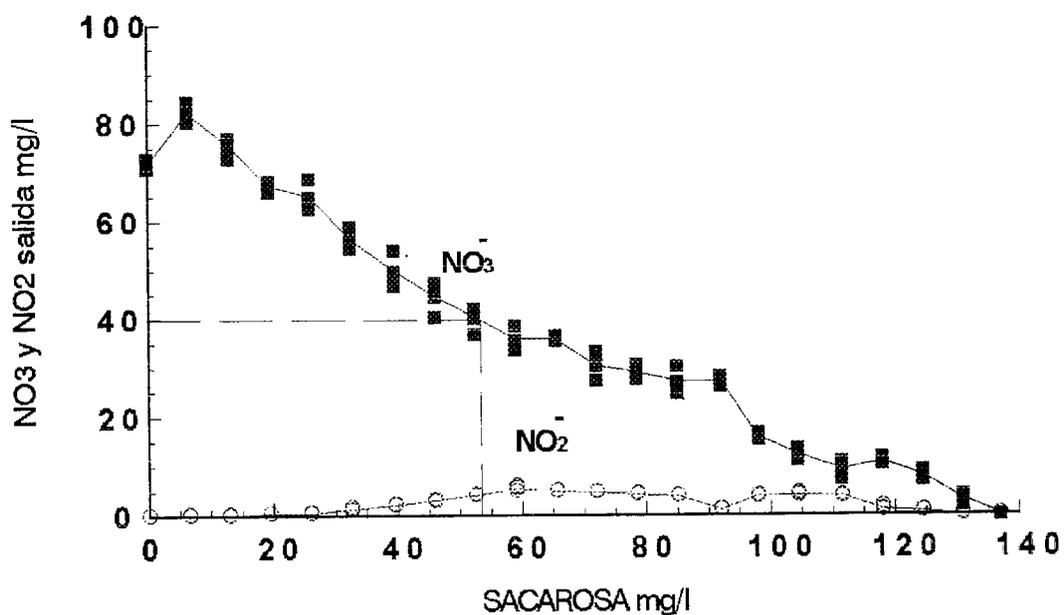
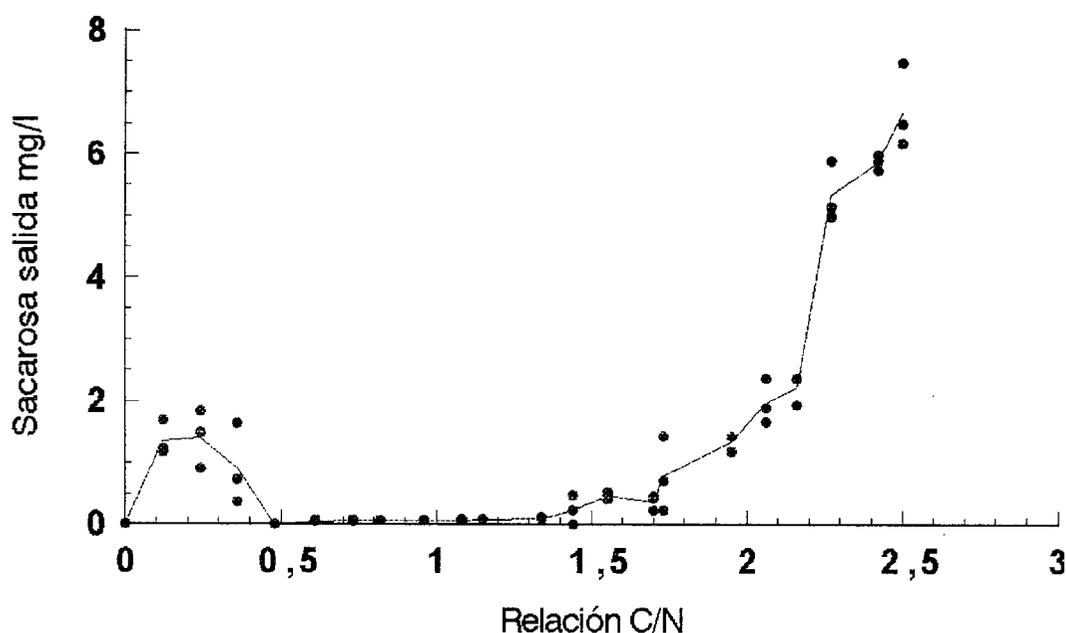


Figura 12. Concentración de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  en el agua tratada en función de la concentración de sacarosa adicionada. Proceso sin O.D. y con 100 mg/l de  $\text{NO}_3^-$  en el agua a tratar.

La fuente de carbono dosificada no se consumía completamente por los microorganismos de la biopelícula, quedando cierta cantidad en el agua de salida. Estas concentraciones de salida, tal como se puede apreciar en la figura 13, seguían una tendencia ascendente conforme mayor era la dosificación. Para el caso de la sacarosa, el valor medio máximo registrado en el agua de salida, fue de  $6.73 \pm 0.68$  mg/l, para una dosificación de sacarosa que permitía un rendimiento en eliminación de nitrógeno del 100%. Esto suponía un consumo del 95% de la fuente de carbono adicionada, quedando el resto en el agua de salida. Entre las relaciones C/N 0.5 y 1.2 no se apreciaba sacarosa en la salida.



---

*Figura 3. Concentración de sacarosa en el agua de salida. Proceso sin O.D.*

## 1,2.- METANOL

Al igual que los datos que se obtenían para la sacarosa, en los ensayos con metanol también se registraban valores de eliminación de nitrógeno con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ) para cada concentración de fuente de carbono adicionada. Igualmente los

valores se ajustaban perfectamente a una regresión lineal (tabla 4).

Para este ensayo, los rendimientos de eliminación de nitrógeno para bajas concentraciones de fuente de carbono fueron despreciables, obteniéndose un valor nulo para la ordenada en el origen. A excepción de estos puntos de baja adición de fuente de carbono, con el metanol se lograban mejores rendimientos en la eliminación de nitrógeno del agua a tratar, que para la sacarosa, tal como lo refleja su mayor pendiente de la recta.

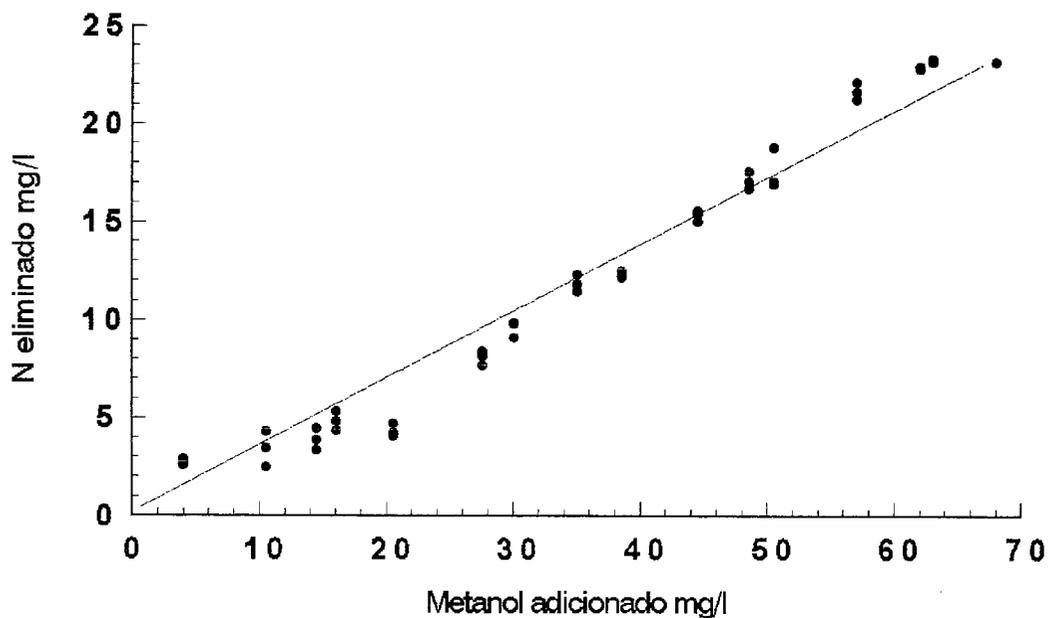
**Tabla 4.- Ajuste lineal obtenido para los ensayos con metanol en ausencia de O.D.**

<b>Ajuste lineal <math>y = a + bx</math></b>				
Variable dependiente: N eliminado				
Variable independiente: Metanol adicionado				
<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>T-estadística</b>	<b>P-valor</b>
<b>Ord. Origen</b>	- 0.43154	0.371595	-3.85241	< 0.04
<b>Pendiente</b>	0.378989	0.00878982	43.1168	< 0.01
<b>Coefficiente de correlación:</b> 0.988112		<b>r<sup>2</sup>:</b> 97.6366 %		
<b>Error estándar de la estimación:</b> 1.1613				

La concentración de metanol que se precisaba para eliminar por completo todo el nitrógeno disuelto en el agua de entrada fue, según la regresión lineal (figura 14), de 63.35 mg/l obteniendo una relación de 0.63 unidades de metanol por unidad de nitrato a eliminar. Esta relación fue inferior a la obtenida para el proceso con sacarosa, sin embargo, al pretender solo eliminar el 50% del nitrógeno de entrada, la relación se mantenía. En este caso para eliminar menor concentración de nitrógeno, la cantidad de metanol necesaria por unidad de nitrato no variaba, debido a que la recta obtenida en el ajuste lineal partía desde 0.

La tendencia de las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  en el agua de salida (figura 15), fue semejante a la que se observaba para la sacarosa, con la diferencia de que el máximo valor obtenido para el  $\text{NO}_2^-$  fue algo menor. En el ensayo, la concentración de  $\text{NO}_2^-$  creció levemente,

llegando a unos valores cercanos a 1 mg/l, para posteriormente descender. Hay que destacar que se llegaron a registrar dos picos anómalos por su mayor concentración, uno de media  $3.083 \pm 0.38$  mg/l para una concentración de metanol que daba un rendimiento en eliminación de nitrógeno del agua a tratar cercano al 53% y otro de  $3.72 \pm 0.43$  mg/l para una adición de metanol que daba un rendimiento del 78%.



**Figura 14. Ajuste lineal entre metanol adicionado y nitrógeno eliminado. Ensayo sin O.D.**

Nuevamente la concentración total aplicada de la fuente de carbono, no se consumía totalmente por parte de los microorganismos que componían la biopelícula (figura 16). En el caso del metanol, la concentración media máxima obtenida en el agua de salida fue  $4.02 \pm 0.53$  mg/l, cuando la dosificación de fuente de carbono era la necesaria para eliminar totalmente los 100 mg/l de  $\text{NO}_3^-$  del agua de entrada, esto suponía una concentración en la salida de casi un 6% del total adicionado, valor algo superior al obtenido para los ensayos con sacarosa. Cabe destacar que en todos los casos existía metanol en la salida.

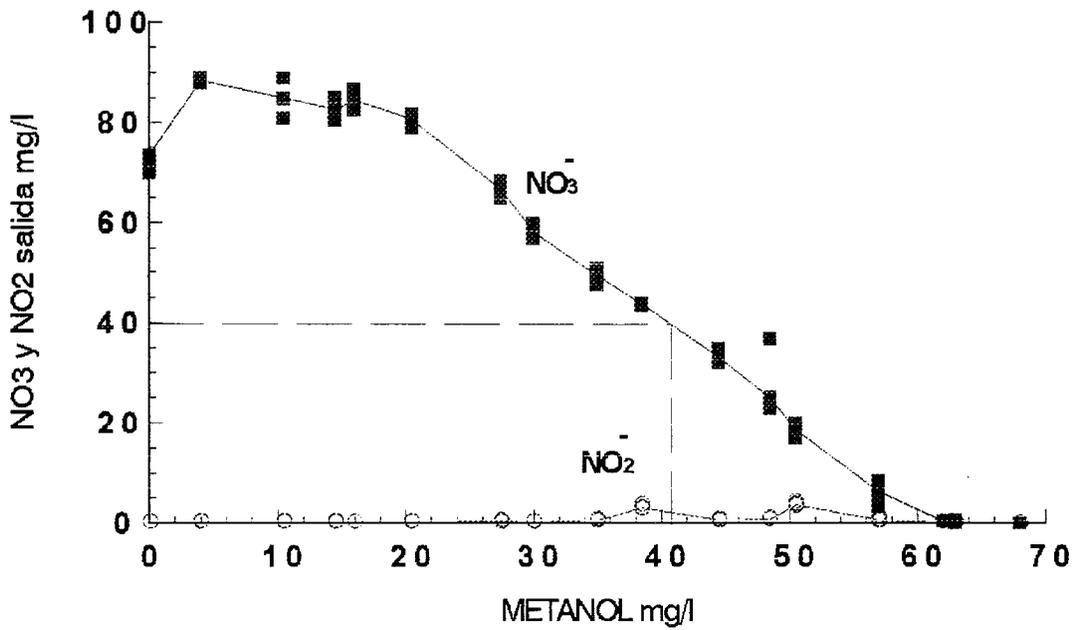


Figura 15. Concentración de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  en el agua tratada en función de la concentración de metanol adicionada. Proceso sin O.D. y con 100 mg/l de  $\text{NO}_3^-$  en el agua a tratar.

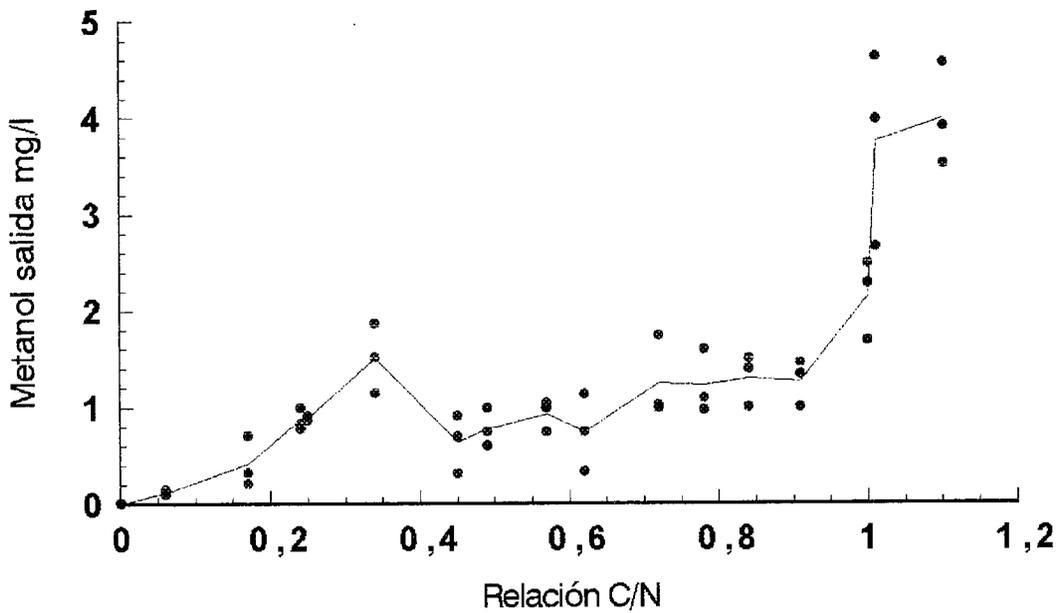


Figura 16. Concentración de metanol en el agua de salida. Proceso sin O.D.

### 1,3.- ETANOL

Los valores de eliminación de nitrógeno, con respecto a la concentración suministrada de etanol, se ajustaban a una regresión lineal (tabla 5) tal como sucedía con el metanol y la sacarosa. Igualmente todos los datos de eliminación de nitrógeno presentaban diferencias estadísticamente significativas para cada dosificación de fuente de carbono ( $p < 0.001$ ), tal como lo reflejaba el análisis de varianza correspondiente.

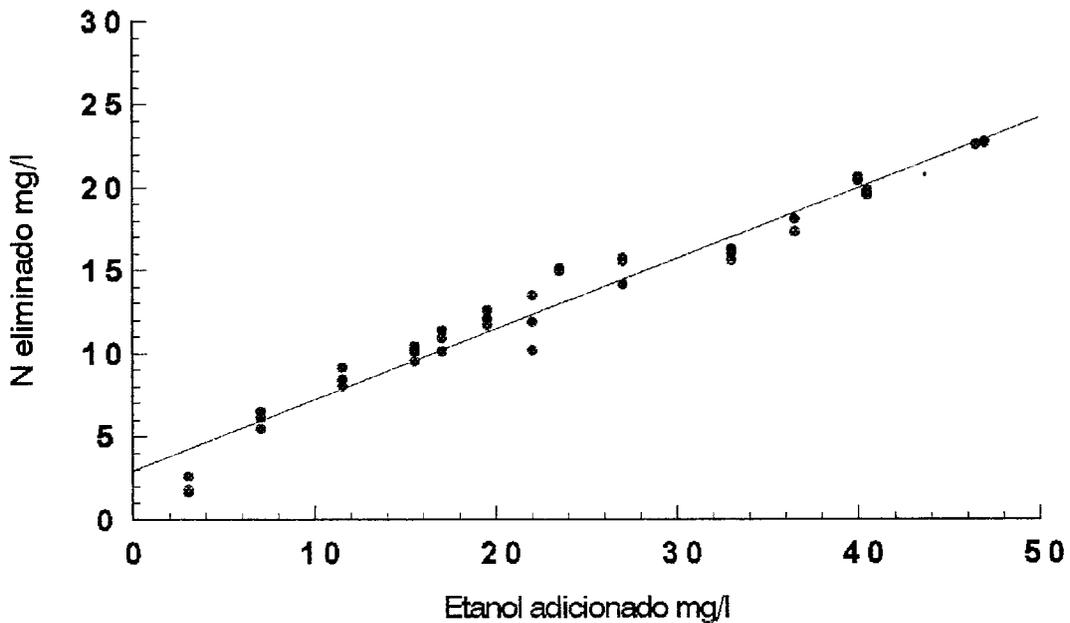
**Tabla 5.- Ajuste lineal obtenido para los ensayos con etanol en ausencia de O.D.**

<b>Ajuste lineal <math>y = a + bx</math></b>				
Variable dependiente: N eliminado				
Variable independiente: Etanol adicionado				
<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>T-estadística</b>	<b>P-valor</b>
<b>Ord. Origen</b>	3.28962	0.349087	9.42384	< 0.01
<b>Pendiente</b>	0.41606	0.0117665	35.3596	< 0,01
<b>Coefficiente de correlación:</b> 0.983616 <b>r<sup>2</sup>:</b> 96.75 %				
<b>Error estándar de la estimación:</b> 1.04447				

Para este caso, el valor de nitrógeno que se eliminaba sin adición de fuente de carbono (ordenada en el origen) fue de 3.27 mg/l de nitrógeno, algo menor que para la sacarosa y superior al obtenido para el metanol. En cuanto a la pendiente obtenida, fue la mayor de los tres ensayos realizados, ya que en este caso se precisaba menos concentración de fuente de carbono para igual eliminación de nitrógeno.

Si se interpolaba en la representación del ajuste lineal (figura 17), se observaba que la cantidad de etanol necesaria para eliminar los 100 mg/l de  $\text{NO}_3^-$  del agua de entrada era de 46.36 mg/l, la menor de las tres fuentes de carbono estudiadas. La relación obtenida para este estudio fue de 0.46 unidades de etanol por cada unidad de nitrato eliminado.

Al contrario de lo que sucedía para el metanol, si se pretendía solo eliminar el 50% del nitrógeno presente en el agua de entrada, la relación descendía casi un 16.4% (0.38). Este descenso fue menor que el obtenido para la sacarosa, pero debido a la mayor pendiente de la recta de ajuste, las concentraciones requeridas para eliminar igual concentración de nitrógeno fueron menores para el etanol, a excepción de los valores cercanos a la ordenada en el origen.



**Figura 17. Ajuste lineal entre etanol adicionado y nitrógeno eliminado. Ensayo sin O.D.**

A excepción de los valores que se obtenían para pequeñas dosificaciones de etanol, la tendencia de la concentración del  $\text{NO}_3^-$  en el agua de salida fue descender conforme se incrementaba la dosificación de fuente de carbono (figura 18).

El  $\text{NO}_2^-$  al igual que lo sucedido para la sacarosa y el metanol presentaba una tendencia ascendente, para posteriormente descender conforme se adicionaba más fuente de carbono. La concentración media máxima alcanzada fue de  $4.96 \pm 0.378$  mg/l para una dosificación de etanol que permitía un rendimiento de eliminación de nitrógeno, presente en el agua a tratar, del 77%.

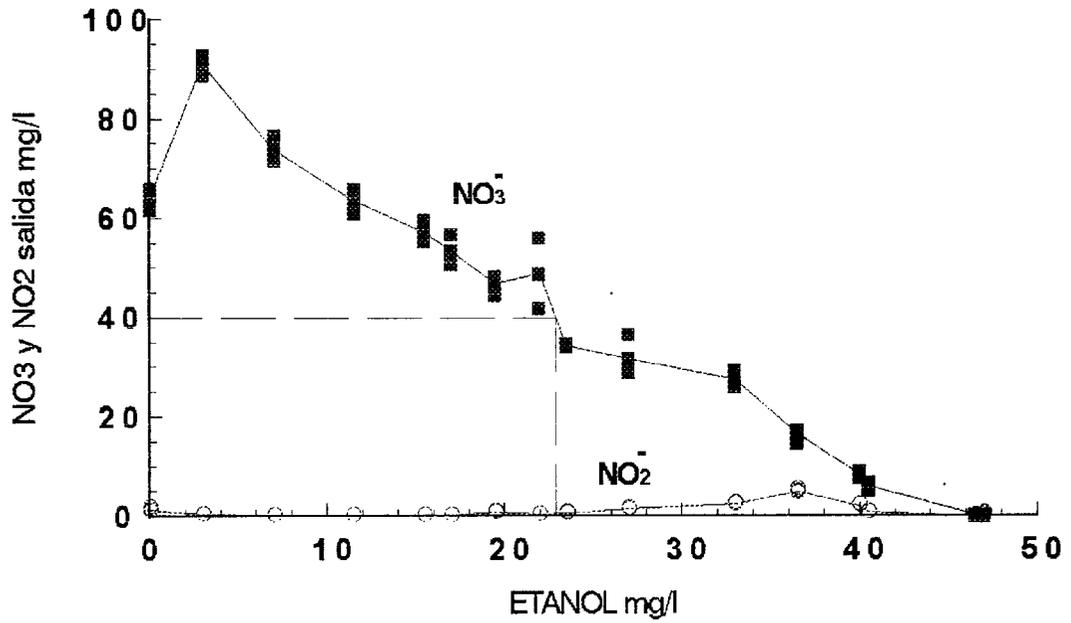


Figura 18. Concentración de  $NO_3^-$  y  $NO_2^-$  en el agua tratada en función de la concentración de etanol adicionada. Proceso sin O.D. y con 100 mg/l de  $NO_3^-$  en el agua a tratar.

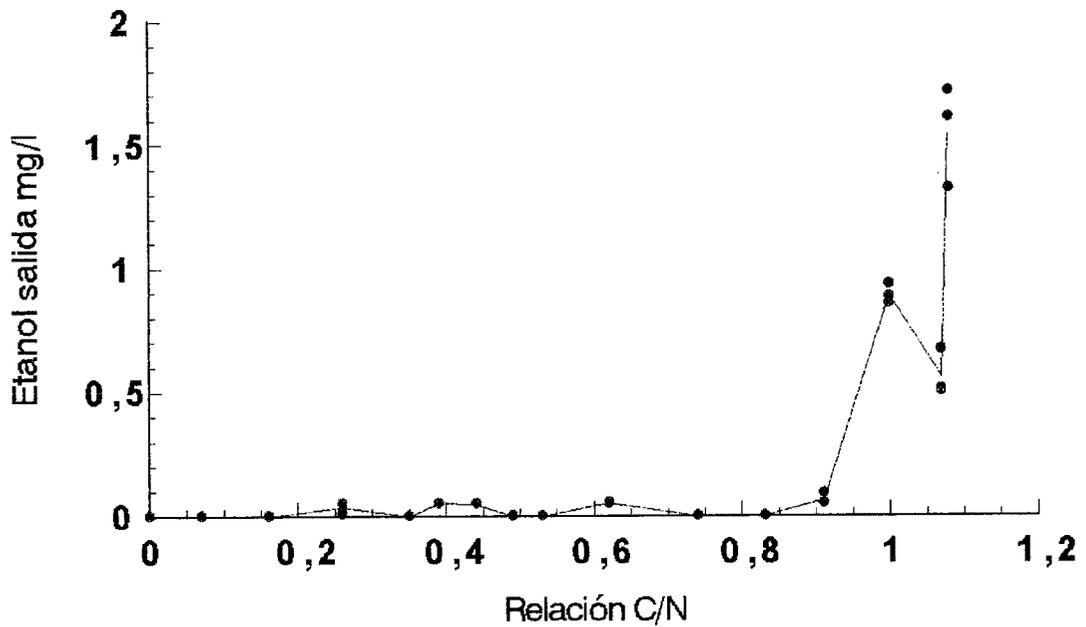


Figura 19. Concentración de etanol en el agua de salida. Ensayo sin O.D.

Los valores de fuente de carbono en el agua de salida se mantuvieron en un valor muy bajo (figura 19), manifestando en este caso un consumo de casi el 100% del adicionado. Solo en puntos donde la dosificación de fuente de carbono permitía la eliminación casi total de nitrógeno presente en el agua de entrada, se registraban valores significativos de etanol en la salida, siendo estos nulos para la relación C/N 0.8. Hay que indicar que la concentración máxima registrada fue de  $1.55 \pm 0.2$  mg/l, un valor muy inferior al que se detectaba para los ensayos con metanol y sacarosa.

## **2.- INFLUENCIA DEL OXÍGENO**

Este estudio se realizó desde dos puntos de vista diferentes. Por un lado se mantuvieron las condiciones de trabajo de la fase anterior, pero con una concentración de 4.5 mg/l de oxígeno disuelto en el agua de entrada. Esto nos permitió comparar los proceso en presencia o ausencia de oxígeno. Por otro lado y con la idea de analizar la influencia de la mayor o menor concentración de oxígeno en el rendimiento del sistema, esta se incrementó manteniendo constante la concentración de fuente de carbono.

### **2.1.- ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DEL SISTEMA, CON INCREMENTO DE FUENTE DE CARBONO, EN PRESENCIA O AUSENCIA DE OXÍGENO.**

En este ensayo y al igual que en el anterior, para cada fuente de carbono se realizó un ajuste lineal, permitiéndonos comparar los procesos con y sin oxígeno disuelto en el agua a tratar. Se estudiaron igualmente las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  y fuente de carbono en el agua de salida.

#### **2.1.1.- Sacarosa**

Los datos de eliminación de nitrógeno obtenidos para cada concentración de sacarosa adicionada, presentaban diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $P < 0.001$ ), según

lo obtenido en el análisis de varianza correspondiente.

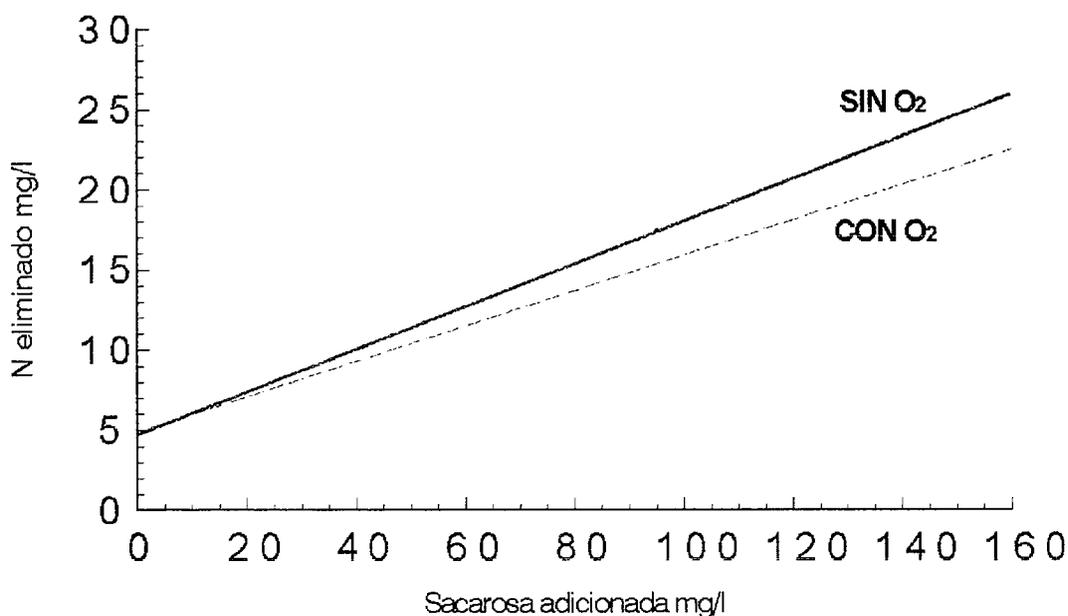
**Tabla 6.- Ajuste lineal obtenido para los ensayos con sacarosa en presencia de O.D. (4.5 mg/l).**

<b>Ajuste lineal</b> $y = a + bx$				
Variable dependiente: N eliminado				
Variable independiente: Sacarosa adicionada				
<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>T-estadística</b>	<b>P-valor</b>
<b>Ord. Origen</b>	4.95223	0.379406	13.0526	< 0.01
<b>Pendiente</b>	0.110569	0.0045438	24.3337	< 0,01
<b>Coefficiente de correlación:</b> 0.949978		<b>r<sup>2</sup>:</b> 90.2458 %		
<b>Error estándar de la estimación:</b> 1.67293				

Como se puede apreciar en la tabla 6, existía una correlación entre los datos de eliminación de nitrógeno y la concentración de sacarosa adicionada, ajustándose dichos valores a una regresión lineal. Al igual que en el estudio sin oxígeno, se obtuvo un valor alto de eliminación de nitrógeno en ausencia de fuente de carbono (ordenada en el origen). Sin embargo la pendiente de la recta fue menor, por lo que para eliminar igual cantidad de nitrógeno se precisaban mayores concentraciones de sacarosa. Al igual que en los estudios sin oxígeno, la sacarosa presentaba una pendiente de la recta inferior a la de los alcoholes etanol y metanol, con una relación de 1.59 unidades de sacarosa por cada unidad de nitrato a eliminar.

Al comparar los ajustes lineales obtenidos con y sin oxígeno para la sacarosa (Figura 20), se observaba como en todo momento el proceso sin oxígeno ofrecía mejores rendimientos para igual dosificación de fuente de carbono. Así para eliminar por completo los 100 mg/l de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (22.58 mg N/l) que contenía el agua de entrada, se precisaba una dosificación de 159.4 mg/l de sacarosa en presencia de oxígeno, mientras que en el ensayo sin oxígeno disuelto en el agua a tratar, la dosificación fue de 133.35 mg/l, un 16.3% menos. Esta diferencia fue inferior, si se eliminaba menos cantidad de nitrógeno del agua de entrada. Así para eliminar el 50% del

nitrógeno de entrada se precisaba una concentración de 57.3 mg/l de sacarosa, mientras que en ausencia de oxígeno esta concentración descendía un 15% ( 48.6 mg/l).

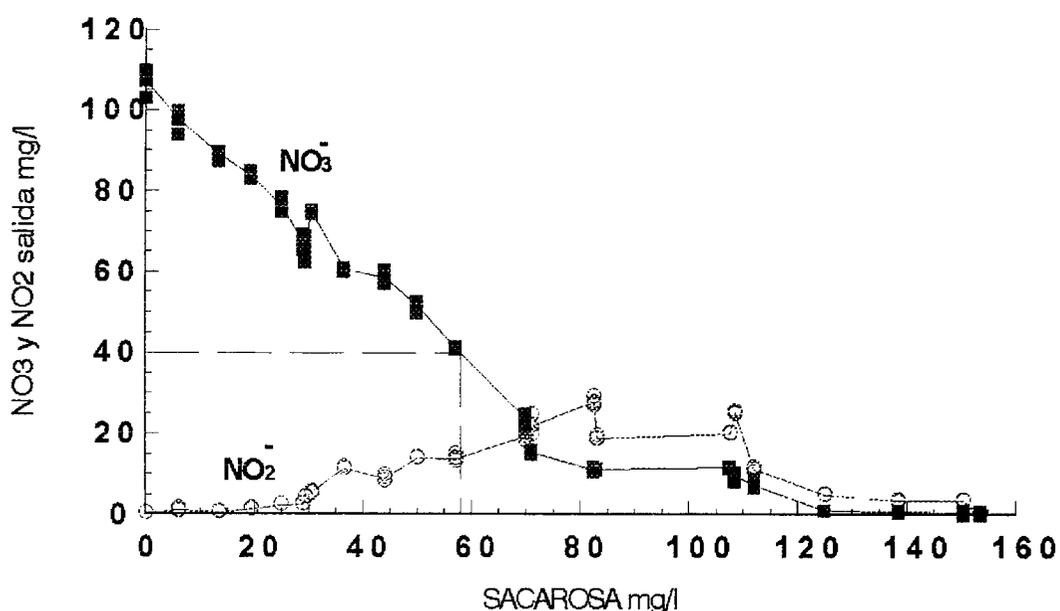


**Figura 20. Ajustes lineales obtenidos para sacarosa en presencia ó ausencia de O.D.**

Si atendemos a las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  en el agua de salida, para el proceso con oxígeno en el agua de entrada (figura 21), podemos observar como había una variación en cuanto a las concentraciones de ambos en el agua de salida para las diferentes dosificaciones de fuente de carbono, con respecto al proceso sin oxígeno. Las mayores variaciones se observaron para la concentración de  $\text{NO}_2^-$ , llegándose a registrar valores medios máximos de  $27.8 \pm 1.22$  mg/l para dosificaciones de sacarosa que permitían la eliminación del 50.7% del nitrógeno presente en el agua a tratar. Para mayores porcentajes de eliminación, la concentración de  $\text{NO}_2^-$  se mantenía por encima de la de  $\text{NO}_3^-$ , hasta eliminarse por completo todo el nitrógeno contenido en el agua de entrada.

En lo que respecta a las concentraciones de sacarosa en el agua de salida (figura 22), se observaba que a pesar del incremento en la dosificación de sacarosa, en el agua de salida se registraban valores semejantes, que oscilaban en torno a la concentración de 1 mg/l de sacarosa.

Estos valores fueron mayores que los registrados en el proceso sin oxígeno, sin embargo, experimentaban un incremento a partir de la relación C/N 2 hasta llegar a un valor medio máximo de  $4.43 \pm 0.28$  mg/l para una dosificación de sacarosa que permitía la eliminación de todo el nitrógeno presente en el agua de entrada. Este valor fue inferior al máximo obtenido en los ensayos sin oxígeno.



**Figura 21.** Concentración de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  en el agua tratada en función de la concentración de sacarosa adicionada. Proceso con O.D. (4.5 mg/l) y con 100 mg/l de  $\text{NO}_3^-$  en el agua a tratar.

### 2,1,2.- Metanol

Los valores de eliminación de nitrógeno se correlacionaban con las concentraciones dosificadas de metanol, ajustándose, al igual que en el estudio sin oxígeno, a una regresión lineal (tabla 7). Para cada concentración de metanol dosificada, se obtenían valores de nitrógeno eliminado, que presentaban diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $p < 0.001$ ).

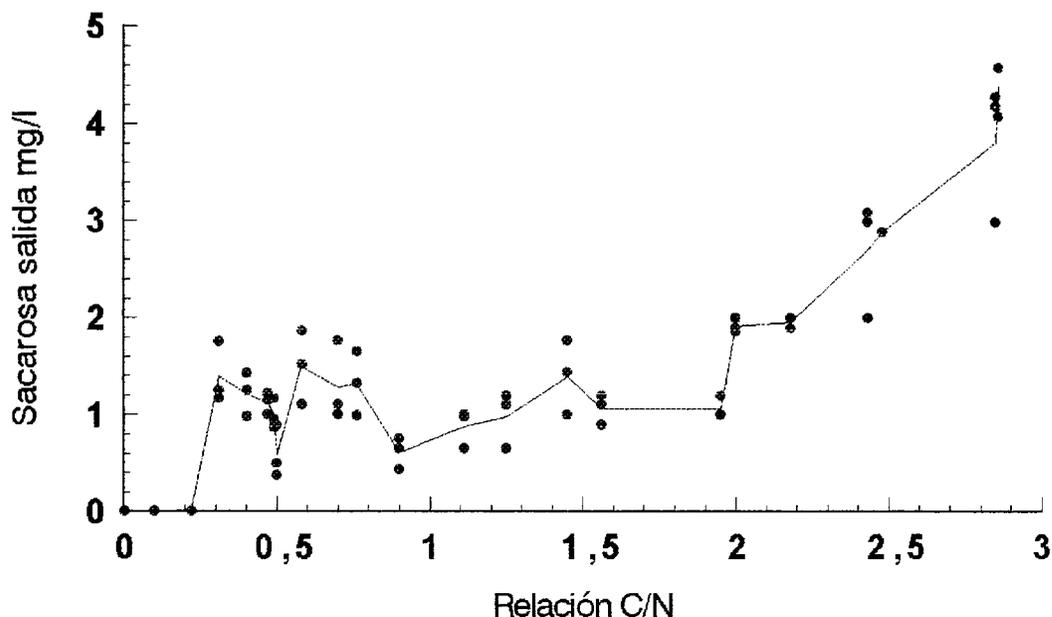


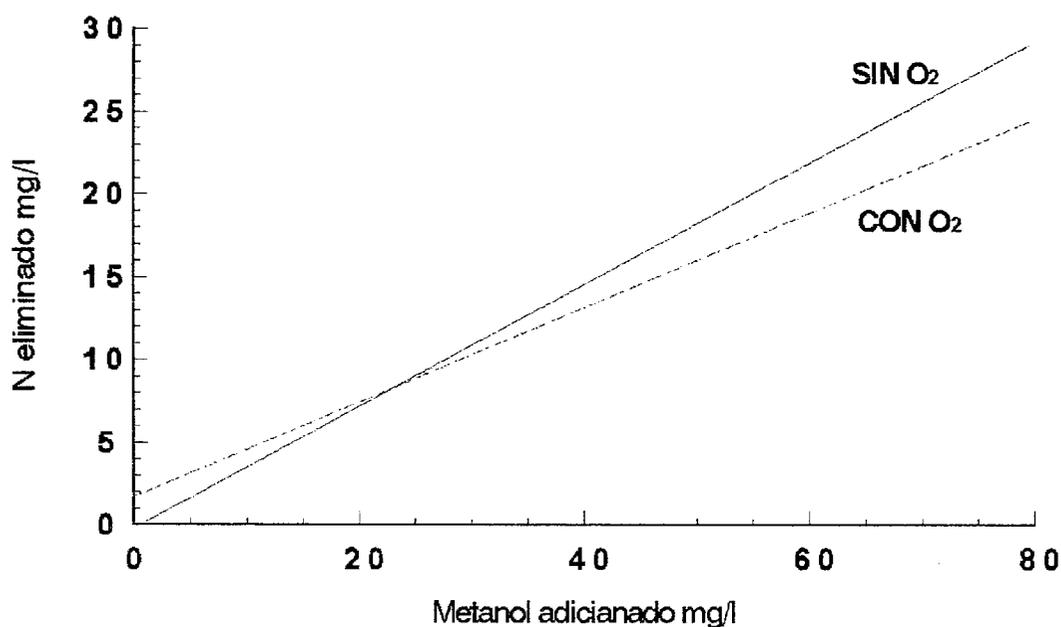
Figura 22. Concentración de sacarosa en el agua de salida. Proceso con O.D. (4.5 mg/l).

Tabla 7.- Ajuste lineal obtenido para los ensayos con metanol en presencia de O.D. (4.5 mg/l).

Ajuste lineal $y = a + bx$				
Variable dependiente: N eliminado				
Variable independiente: Metanol adicionado				
Parámetro	Estimación	Error estándar	T-estadística	P-valor
Ord. Origen	1.71076	0.234347	7.30012	< 0.01
Pendiente	0.286666	0.005142	55.7442	< 0,01
Coeficiente de correlación: 0.990483		$r^2$ : 98.1057 %		
Error estándar de la estimación: 0.908946				

Si observamos la comparación de las regresiones lineales obtenidas en ausencia y presencia de oxígeno (figura 23), podumos apreciar como para eliminar valores altos de nitrógeno se precisaba menor concentración de metanol, en ausencia de oxígeno, que si este estaba presente en el agua a tratar. Estos valores llegaron a ser un 13% menos, para eliminar los 100 mg/l de  $\text{NO}_3^-$

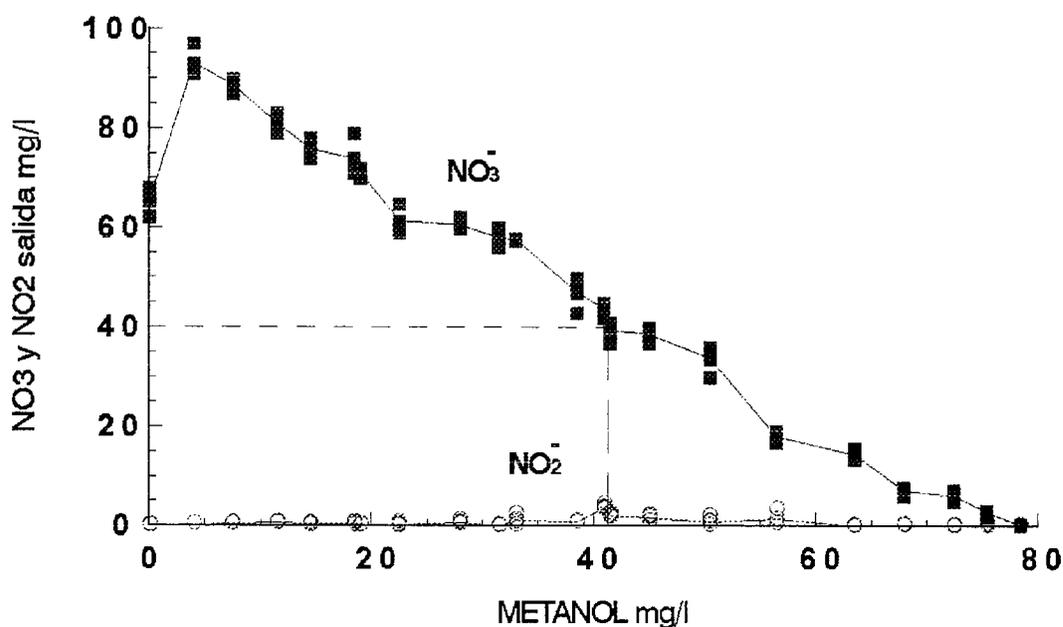
del agua de entrada. Ahora bien, para eliminar solo el 50% de nitrógeno presente en el agua de entrada las concentraciones de fuente de carbono fueron prácticamente iguales. Si la concentración de nitrógeno a eliminar era inferior a los 50 mg/l, la concentración de metanol que se necesitaba era superior en ausencia de oxígeno. Esto era debido a la mayor pendiente de la recta obtenida en el proceso sin oxígeno y a la mayor ordenada en el origen, manifestada por el ensayo con oxígeno.



---

**Figura 23.** Ajustes lineales obtenidos para metanol en presencia ó ausencia de O.D.

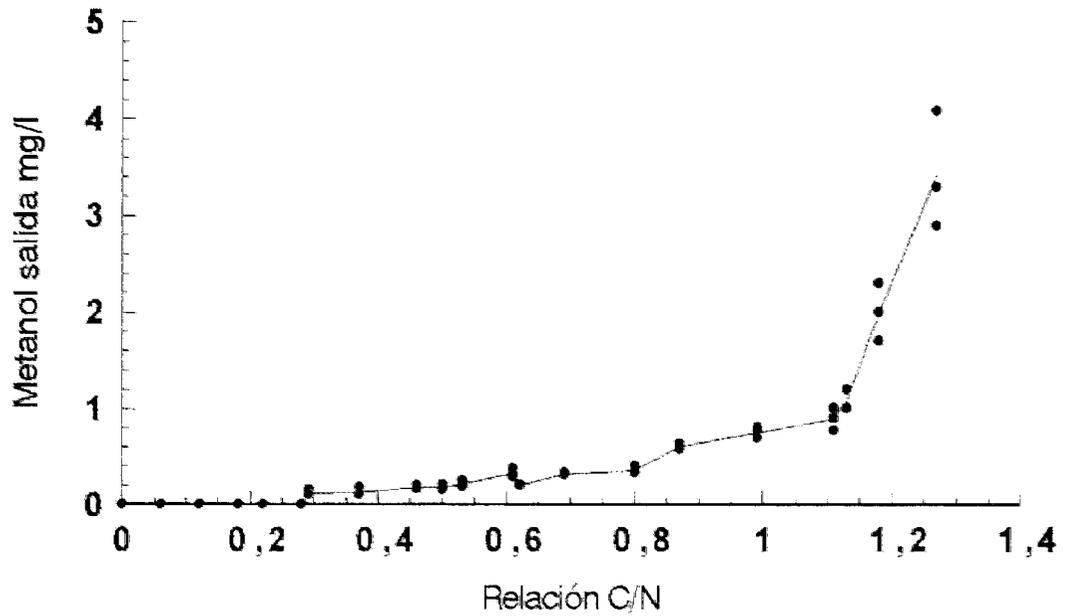
Al igual que sucedía en el ensayo de metanol sin oxígeno, los valores de  $\text{NO}_3^-$  en el agua de salida fueron menores cuando no se empleaba fuente de carbono, que para pequeñas dosis de esta (figura 24). Igualmente, las concentraciones de este anión descendían conforme se incrementaba la dosificación de fuente de carbono.



**Figura 24.** Concentración de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  en el agua tratada en función de la concentración de metanol adicionada. Proceso con O.D. (4.5 mg/l) y con 100 mg/l de  $\text{NO}_3^-$  en el agua a tratar.

La tendencia de los valores de  $\text{NO}_2^-$ , tal y como sucedía para el proceso sin oxígeno, no fue claramente de ascenso con posterior descenso. Los valores registrados fueron, por lo general semejantes, manteniéndose cercanos a 0.5 mg/l. La media máxima registrada fue de  $3.76 \pm 0.59$  mg/l para una dosificación de 41.15 mg/l de metanol, con la que se lograba un 56.4% de eliminación de nitrógeno del agua de entrada.

Los valores de metanol obtenidos en la salida siguieron una tendencia ascendente, conforme aumentaba la concentración de fuente de carbono dosificada. Para este caso los valores fueron algo inferiores a los que se registraban en el estudio sin oxígeno, pero experimentaban un incremento en los puntos donde se alcanzaba el 100% de eliminación de nitrógeno llegando a un máximo de  $3.43 \pm 0.6$  mg/l (figura 25).



*Figura 25. Concentración de metanol en el agua de salida. Proceso con O.D. (4.5 mg/l).*

### 2,1,3.- Etanol

Al igual que para el resto de ensayos, en el caso del etanol se obtenía un perfecto ajuste lineal (tabla 8). Los valores de eliminación de nitrógeno del agua de entrada, obtenidos para cada concentración de etanol, presentaban diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $P < 0.001$ ). Al igual que sucedía en los ensayos en ausencia de oxígeno, el etanol presentaba los mejores resultados en eliminación de nitrógeno, destacando sobre los rendimientos obtenidos para la sacarosa y siendo semejante al metanol.

La ordenada en el origen, al igual que la pendiente, fueron menores que para el proceso en ausencia de oxígeno, por lo que también se observaba una influencia negativa, aunque menos acentuada que para la sacarosa y parecida a la del metanol.

**Tabla 8.- Ajuste lineal obtenido para los ensayos con etanol en presencia de O.D. (4.5 mg/l).**

<b>Ajuste lineal <math>y = a + bx</math></b>				
Variable dependiente: N eliminado				
Variable independiente: Etanol adicionado				
<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>T-estadística</b>	<b>P-valor</b>
<b>Ord. Origen</b>	2.67335	0.426137	6.27345	< 0.01
<b>Pendiente</b>	0.382089	0.0108904	35.0848	< 0,01
<b>Coefficiente de correlación:</b> 0.981823		<b>r<sup>2</sup>:</b> 96.3977 %		
<b>Error estándar de la estimación:</b> 1.48095				

Si comparamos las dos representaciones gráficas obtenidas de las regresiones lineales (figura 26), vemos que en todo momento, en el proceso sin oxígeno, la eliminación de nitrógeno fue superior para igual adición de fuente de carbono. Así, mientras que en el proceso con oxígeno se precisaban 52.1 mg/l de etanol para eliminar los 100 mg/l de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, en ausencia de este solo se necesitaban 46.36 mg/l de fuente de carbono, un 11% menos. Debido a la semejanza ordenada en el origen, las dos rectas tendían a acercarse, cuanto menor cantidad de nitrógeno se pretendía eliminar. Así para obtener un rendimiento del 50% en el proceso con oxígeno se necesitaba una concentración de 22.5 mg/l de etanol, mientras que en ausencia de oxígeno este valor era de 19.22 mg/l.

La tendencia de los valores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NO<sub>2</sub><sup>-</sup> fue muy semejante a la que se observaba en el estudio sin oxígeno, aunque el descenso fue más lento (figura 27). El NO<sub>2</sub><sup>-</sup> volvió a presentar una tendencia ascendente llegando a un valor medio máximo de 3±0.028 mg/l, para una dosificación de etanol de 49.21 mg/l con la que se obtenía un rendimiento en eliminación de nitrógeno del 85%. Nuevamente apareció en la salida cierta cantidad de fuente de carbono (figura 28), cuya tendencia fue semejante al estudio sin oxígeno. Los valores máximos se registraban para las dosificaciones de fuente de carbono que eliminaban todo el nitrato presente en el agua de entrada, siendo su valor medio máximo de 1.713±0.015 mg/l.

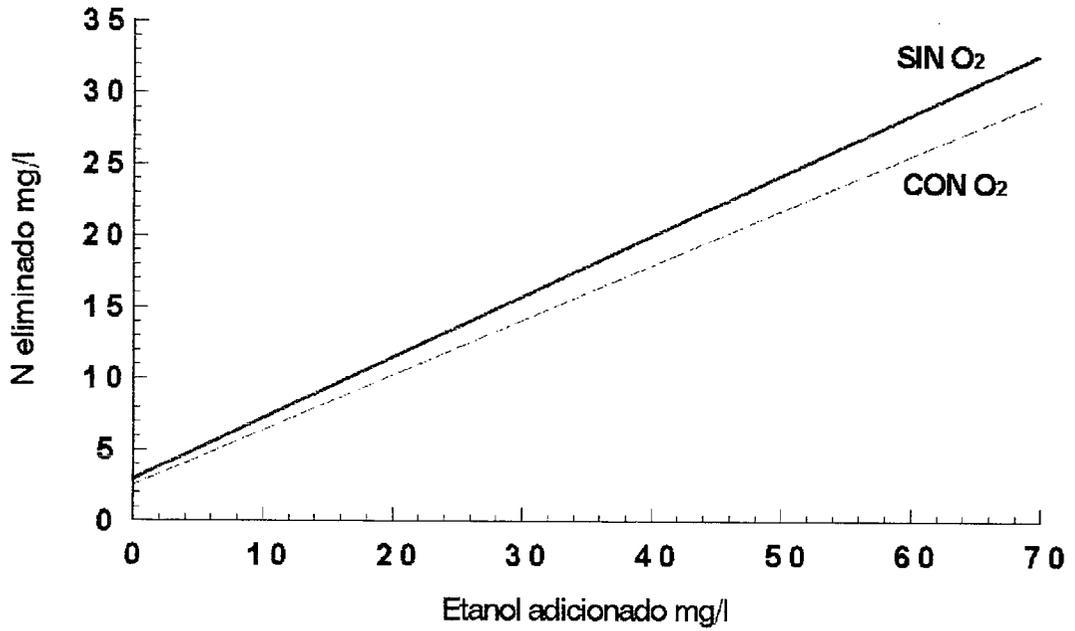


Figura 26. Ajustes lineales obtenidos para etanol en presencia ó ausencia O.D.

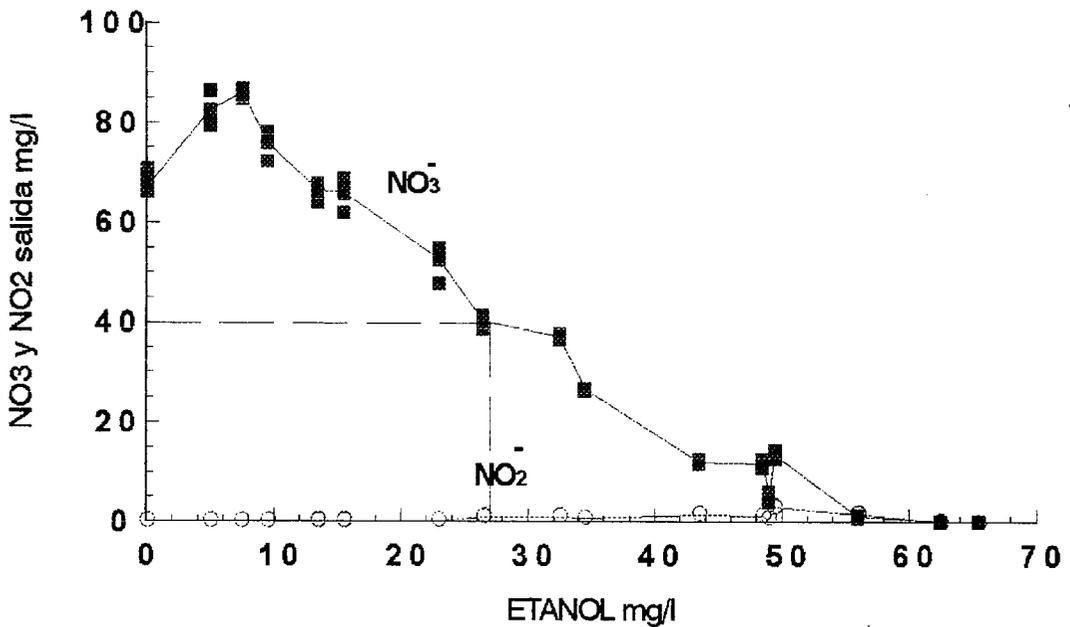


Figura 27. Concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en el agua tratada en función de la concentración de etanol adicionada. Proceso con O.D. (4.5 mg/l) y con 100 mg/l de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el agua a tratar.

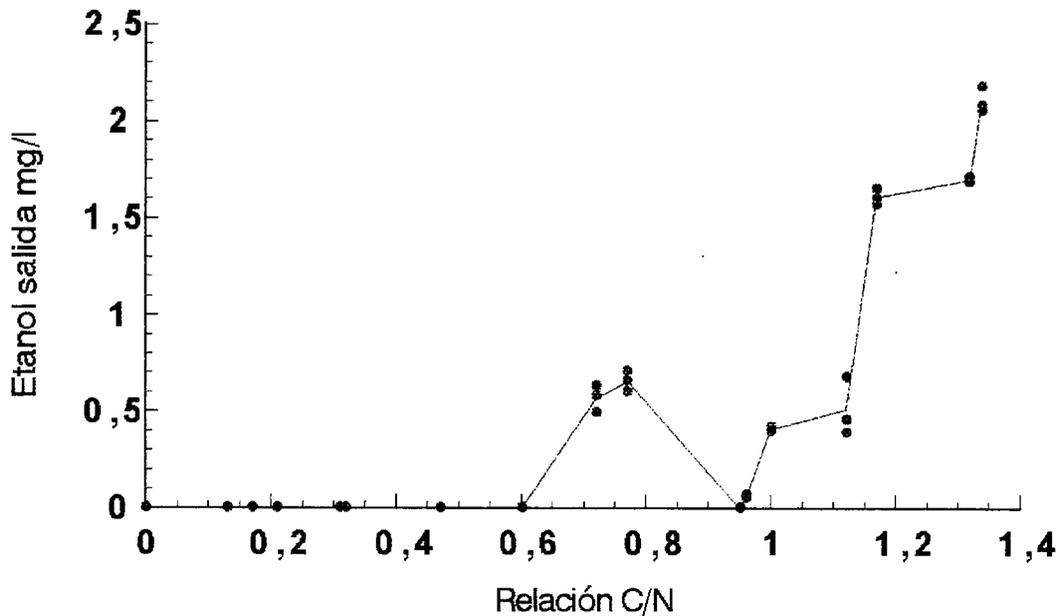


Figura 28. Concentración de etanol en el agua de salida. Proceso con O.D. (4.5 mg/l).

## 2,2.- INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO EN LA CAPACIDAD DE ELIMINACIÓN DE NITRATO.

Para estudiar el comportamiento del sistema, en función de las diferentes concentraciones de oxígeno disuelto en el agua a tratar, se estudió la capacidad de eliminar nitrógeno manteniendo constante la concentración de fuente de carbono y variando de forma creciente las concentraciones de oxígeno disuelto. Para cada fuente de carbono se adicionó aquella concentración capaz de eliminar los 100 mg/l de  $\text{NO}_3^-$  contenidos en el agua de entrada, en ausencia de oxígeno, según los ensayos anteriores.

Con el objeto de conocer si existía influencia de la concentración de oxígeno en el rendimiento del sistema, así como en las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  del agua de salida y a su vez conocer si el efecto era indiferente o no para cada fuente de carbono, se realizó un

análisis de varianza de doble vía (ANOVA) para los tres factores, empleando como variables la concentración de oxígeno y el tipo de fuente de carbono.

**Tabla 9. Análisis de varianza realizado para el rendimiento y concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  del agua de salida en función de la concentración de O.D. y tipo de fuente de carbono.**

**Análisis de varianza para el rendimiento**

Fuente de variación	g.l.	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F calculada	Nivel de Significancia
Concentración de $\text{O}_2$	9	3130.36	347.818	99.13	$P < 0.01$
Tipo de Fuente de C	2	1053.51	526.756	150.14	$P < 0.01$
<b>Total (corregido)</b>	89	4457.54			

**Análisis de varianza para la concentración de  $\text{NO}_3^-$  en el agua de salida**

Fuente de variación	g.l.	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F calculada	Nivel de Significancia
Concentración de $\text{O}_2$	9	1319.39	146.599	146.4	$P < 0.01$
Tipo de Fuente de C	2	318.406	159.206	158.98	$P < 0.01$
<b>Total (corregido)</b>	89	1715.90			

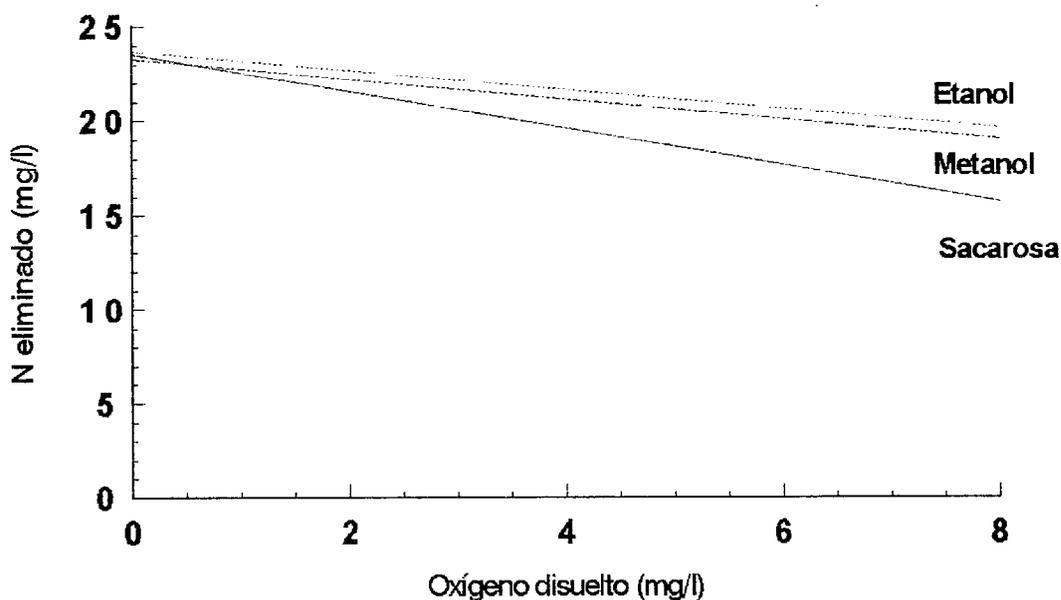
**Análisis de varianza para la concentración de  $\text{NO}_2^-$  en el agua de salida**

Fuente de variación	g.l.	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F calculada	Nivel de Significancia
Concentración de $\text{O}_2$	9	247.579	27.5088	16.68	$P < 0.01$
Tipo de Fuente de C	2	144.396	72.1978	43.78	$P < 0.01$
<b>Total (corregido)</b>	89	520.595			

La tabla 9 refleja los tres análisis de varianza realizados, apreciándose que tanto para los valores obtenidos del rendimiento del sistema, como para las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  del agua de salida, en función de la concentración de oxígeno disuelto en el agua a tratar, existían diferencias estadísticamente significativa. Se apreciaba de este modo que existía una influencia del

oxígeno no solo para la capacidad de eliminación de nitrógeno, sino también para las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  en el agua de salida. Por otro lado se observaba que la influencia del oxígeno no fue igual para cada una de las fuentes de carbono ensayadas, apreciándose también diferencias estadísticamente significativas en los valores obtenidos para cada fuente de carbono.

La figura 29 muestra la capacidad de eliminar nitrógeno de la planta piloto para cada fuente de carbono en función del oxígeno disuelto en el agua a tratar. En ella se observa que la influencia de la concentración de oxígeno disuelto en el agua a tratar fue diferente para cada fuente de carbono ensayada afectando más negativamente a la sacarosa que a los alcoholes etanol y metanol.



**Figura 29. Influencia del oxígeno en la capacidad de eliminación de nitrógeno para cada fuente de carbono ensayada: Regresiones lineales.**

### 2,2,1.- Sacarosa

La sacarosa fue la fuente de carbono más afectada por el incremento en las concentraciones de oxígeno disuelto. La pendiente obtenida en el ajuste lineal, fue negativa, al igual que para el resto, pero su valor fue el más alto (tabla 10). Esto indicaba una disminución de la cantidad de nitrógeno eliminado conforme aumentaba la concentración de oxígeno disuelto en el agua a tratar. La presencia de oxígeno descendía el rendimiento para este caso desde un 100% en ausencia total de oxígeno, hasta un 50% para valores de 7.5 mg/l de oxígeno disuelto.

La mayor o menor presencia de oxígeno disuelto en el agua, afectaba negativamente tanto a la concentración de  $\text{NO}_3^-$  como de  $\text{NO}_2^-$  (figura 30), llegando a variar desde 0 mg/l para cada uno en ausencia de oxígeno disuelto, a valores de 26.5 mg/l y 17.1 mg/l para  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  respectivamente, en presencia de 7.5 mg/l de oxígeno disuelto. Estas concentraciones fueron las más altas de las tres fuentes de carbono ensayadas.

**Tabla 10.- Ajuste lineal obtenido para la influencia del O.D. en la capacidad de eliminar nitrógeno, empleando sacarosa .**

<b>Ajuste lineal <math>y = a + bx</math></b>				
Variable dependiente: N eliminado				
Variable independiente: Oxígeno disuelto				
<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>T-estadística</b>	<b>P-valor</b>
<b>Ord. Origen</b>	23.5129	0.445508	52.7777	< 0.01
<b>Pendiente</b>	-0.959244	0.103187	-9.29616	< 0,01
<b>Coefficiente de correlación: -0.807847      <math>r^2</math>: 65.2617 %</b>				
<b>Error estándar de la estimación: 1.71063</b>				

### 2,2,2.- Metanol

La pendiente de la recta para el caso del metanol (tabla 11) fue menos pronunciada que

la obtenida para la sacarosa, pero algo superior a la del etanol, por lo que la eliminación de nitrógeno se veía más influenciada para este caso por los incrementos de oxígeno disuelto.

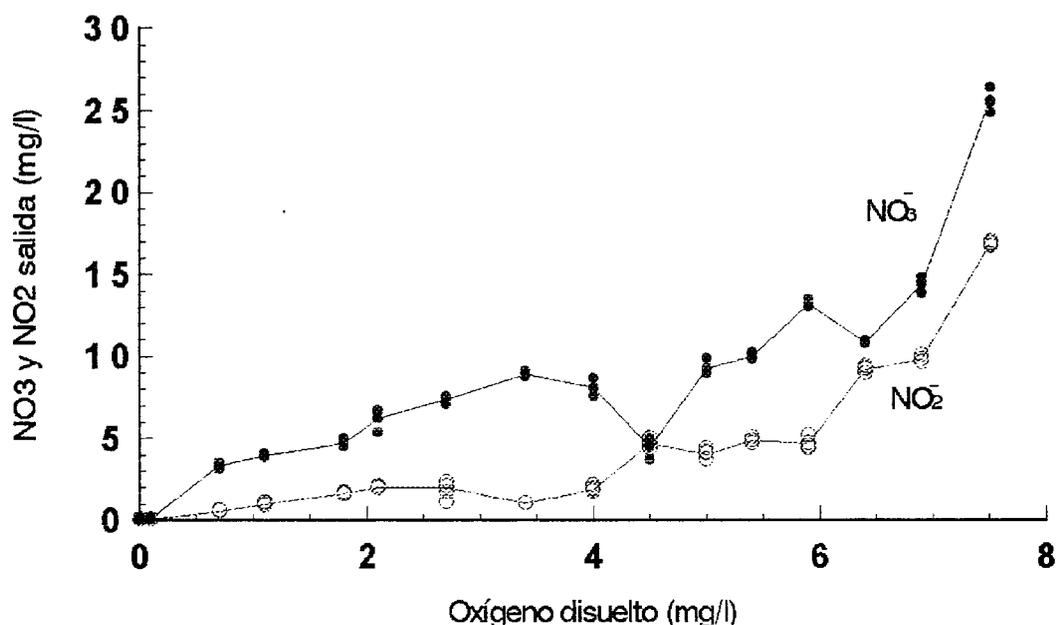
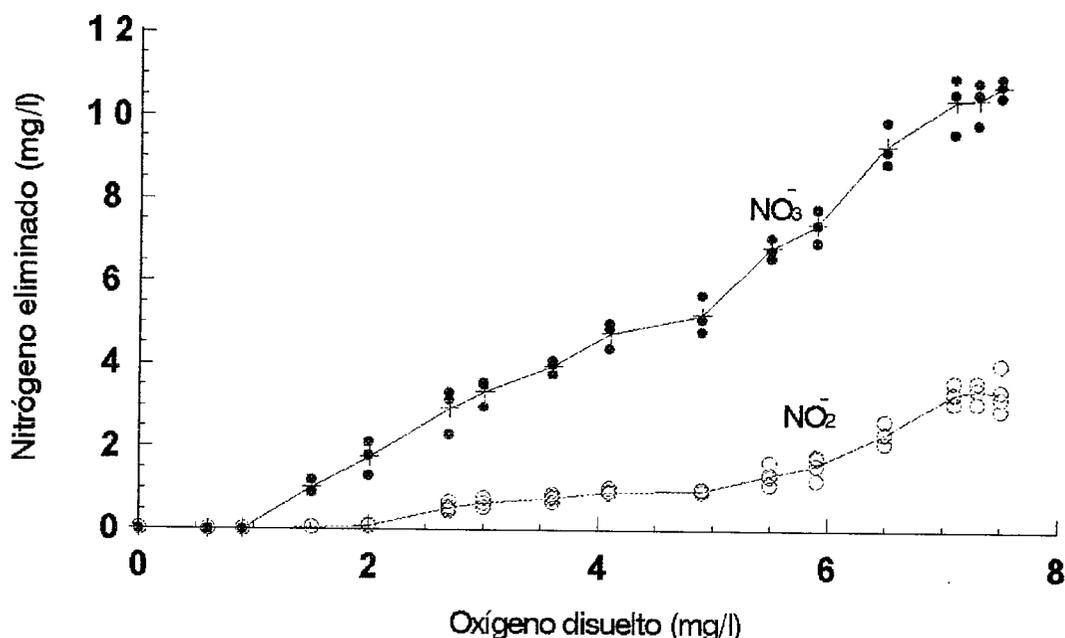


Figura 30. Valores de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  en el agua de salida, en función de la concentración de O.D. Ensayo realizado con sacarosa.

Tabla 11.- Ajuste lineal obtenido para la influencia del O.D. en la capacidad de eliminar nitrógeno empleando metanol.

Ajuste lineal $y = a + bx$				
Variable dependiente: N eliminado				
Variable independiente: Oxígeno disuelto				
Parámetro	Estimación	Error estándar	T-estadística	P-valor
Ord. Origen	23.3175	0.083807	278.228	< 0.01
Pendiente	-0.522782	0.0178656	-29.262	< 0,01
Coeficiente de correlación: -0.974715		$r^2$ : 95.007 %		
Error estándar de la estimación: 0.294546				

Las concentraciones registradas para  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$ , a valores altos de oxígeno eran muy inferiores, con respecto a las registradas para la sacarosa (figura 31). En este caso y para 7.5 mg/l de oxígeno disuelto se detectaban valores máximos de 10.97 mg/l y 4 mg/l respectivamente.



**Figura 31.** Valores de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  en el agua de salida, en función de la concentración de O.D. Ensayo realizado con metanol.

### 2,2,3.- Etanol

Esta fuente de carbono se vio afectada igualmente por la mayor concentración de oxígeno disuelto en el agua a tratar, aunque su efecto fue diferente con respecto a las otras dos fuentes de carbono ensayadas, dándose en menor proporción. La pendiente de la recta obtenida en el ajuste lineal fue la de menor valor de las tres fuentes de carbono ensayadas (tabla 12), por lo que a mayor concentración de oxígeno, el descenso en la cantidad de nitrógeno eliminado se afectaba en menor proporción al emplear etanol. A pesar de ello el rendimiento descendía desde el 100% en ausencia de oxígeno hasta un 86% para 7.0 mg/l de oxígeno disuelto.

**Tabla 12.- Ajuste lineal obtenido para la influencia del O.D. en la capacidad de eliminar nitrógeno empleando etanol.**

**Ajuste lineal**  $y = a + bx$

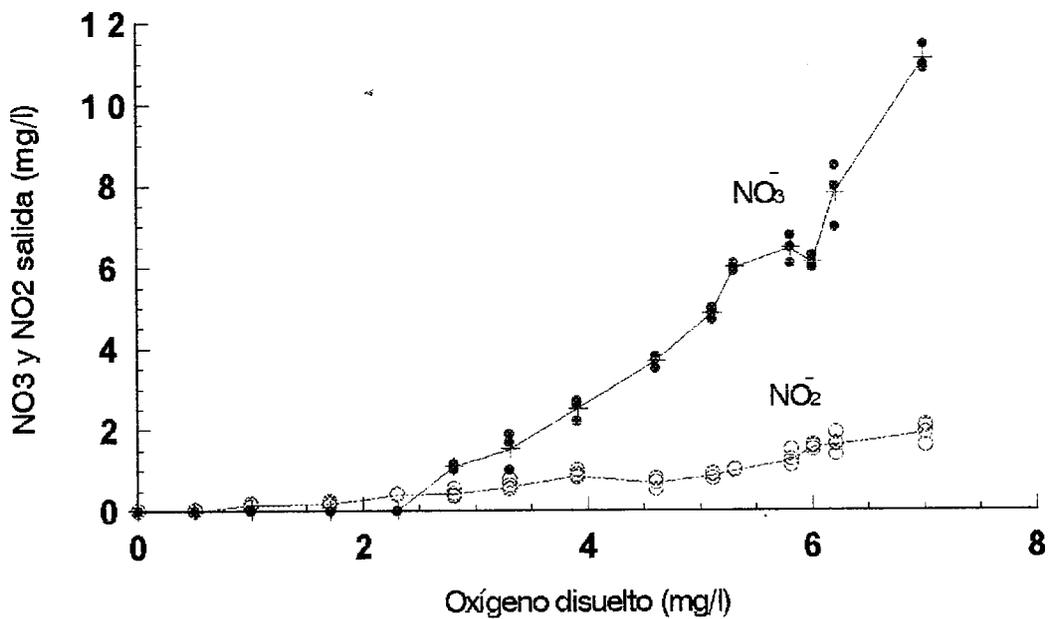
Variable dependiente: N eliminado

Variable independiente: Oxígeno disuelto

Parámetro	Estimación	Error estándar	T-estadística	P-valor
Ord. Origen	23.6809	0.130177	181.913	< 0.01
Pendiente	-0.48854	0.0300243	-16.2715	< 0,01

**Coefficiente de correlación:** -0.929024     **r<sup>2</sup>:** 86.3086%

**Error estándar de la estimación:** 0.421496



**Figura 32. Valores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en el agua de salida, en función de la concentración de O.D. Ensayo realizado con etanol.**

Las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  en el agua de salida se incrementaban, al igual que sucedía para el resto de fuentes de carbono ensayadas, con el incremento del oxígeno disuelto en el agua a tratar. Las concentraciones obtenidas eran inferiores que para la sacarosa, asemejándose más a las obtenidas para el metanol. En este caso las máximas concentraciones en la salida, se registraban para 7 mg/l de oxígeno disuelto en el agua a tratar, obteniéndose 11.5 mg/l y 2.1 mg/l para  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  respectivamente (figura 32).

### **3.- VARIACIONES EN EL TAMAÑO Y COMPOSICIÓN DE LA BIOPELÍCULA.**

Las comunidades bacterianas estudiadas en la composición de la biopelícula fueron los heterótrofos capaces de crecer en ausencia de oxígeno (HAO), los reductores de nitrato y los desnitrificantes. Estas tres comunidades están implicadas en los usos del nitrógeno, bien por vía asimilatoria como desasimilatoria, por lo que formarían parte de la biopelícula desarrollada en el reactor biológico, pudiendo influir en las diferentes transformaciones de compuestos nitrogenados que tenían lugar en la planta piloto.

Por otro lado y debido a que en el sistema se adicionaba una fuente de carbono fácilmente asimilable por los microorganismos de la biopelícula y al no ser limitantes el nitrógeno ni el fósforo, esta biopelícula podía crecer, influyendo en el rendimiento del proceso así como en el funcionamiento del reactor biológico.

Las condiciones de trabajo establecidas fueron las empleadas en los estudios anteriores. Se utilizaron tres diferentes fuentes de carbono (sacarosa, metanol y etanol), las cuales se adicionaron en concentraciones crecientes. Los ensayos se realizaron en ausencia de oxígeno en el agua a tratar y con una concentración de 4.5 mg/l.

### 3,1.- SACAROSA

#### 3,1,1.- Tamaño de la biopelícula.

Los ensayos con sacarosa se realizaron en ausencia y presencia de oxígeno. Para cada ensayo se obtuvieron valores del tamaño de la biopelícula con diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.01$ ) para cada relación C/N ensayada. Se apreció en todo momento un incremento de la biopelícula conforme se aumentaba la dosificación de fuente de carbono (incremento de la relación C/N), ajustándose los datos a una regresión lineal.

**Tabla 13.- Ajustes lineales obtenidos entre el tamaño de la biopelícula y la relación C/N, para los ensayos con sacarosa.**

<b>Ajuste lineal sin oxígeno <math>y = a + bx</math></b>				
Variable dependiente: Tamaño de la biopelícula				
Variable independiente: Relación C/N				
<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>T-estadística</b>	<b>P-valor</b>
<b>Ord. Origen</b>	10.0267	1.86328	5.38121	< 0.01
<b>Pendiente</b>	25.868	1.29781	19.9321	< 0.001
<b>Coefficiente de correlación:</b> 0.98403		<b><math>r^2</math>:</b> 96.8315 %		
<b>Error estándar de la estimación:</b> 4.30681				
<b>Ajuste lineal con oxígeno <math>y = a + bx</math></b>				
Variable dependiente: Tamaño de la biopelícula				
Variable independiente: Relación C/N				
<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>T-estadística</b>	<b>P-valor</b>
<b>Ord. Origen</b>	11.6662	0.591392	19.7267	< 0.001
<b>Pendiente</b>	8.74759	0.335677	26.0595	< 0.001
<b>Coefficiente de correlación:</b> 0.990564		<b><math>r^2</math>:</b> 98.1217 %		
<b>Error estándar de la estimación:</b> 1.39387				

En la tabla 13 se refleja el ajuste lineal que se obtenía entre los valores del tamaño de la biopelícula (mg/g relleno) y la relación C/N, empleando sacarosa como fuente de carbono, tanto para el ensayo con oxígeno disuelto en el agua a tratar como sin el. La pendiente de la recta obtenida para el ensayo sin oxígeno presentaba un valor mucho más alto que para el caso de presencia de oxígeno, siendo dicha pendiente la mayor de entre todos los ensayos realizados.

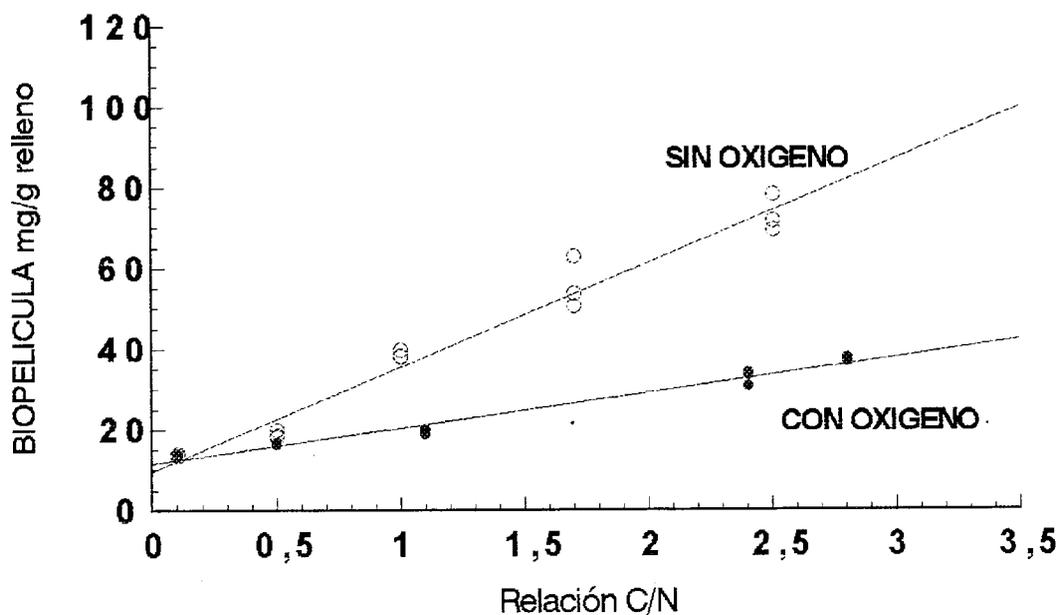
El valor de biopelícula obtenido para los dos ensayos en su fase de formación, fue semejante, siendo este de  $13.43 \pm 0.32$  mg/ g relleno, para los ensayos con oxígeno disuelto en el agua de entrada y de  $13.4 \pm 0.36$  mg/ g relleno, para los estudios sin el. Conforme se aumentaba la dosificación de fuente de carbono estos valores también aumentaban, separándose cada vez más, tal como se aprecia en la figura 33.

El máximo valor de tamaño de biopelícula, para el proceso sin oxígeno, se registraba para una relación C/N de 2.5, el cual alcanzaba un valor medio de  $73.2 \pm 4.56$  mg/g relleno de peso seco. Esto suponía un incremento de 5.5 veces el valor de formación, llegando a dar problemas de atasco del sistema.

En el proceso con oxígeno se observaba un comportamiento similar, pero el valor máximo, que se obtenía para una relación C/N de 2.85, solo fue de  $37.38 \pm 0.56$  mg/g relleno. Esto suponía un incremento de 2.8 veces el valor inicial, casi la mitad de lo que se incrementaba la biopelícula en ausencia de oxígeno. A pesar del menor valor obtenido, este fue superior a los que se registraban para los alcoholes.

### **3,1,2.- Heterótrofos capaces de crecer en ausencia de oxígeno (HAO).**

Al igual que para los ensayos de biopelícula, los datos obtenidos para los HAO presentaban diferencias estadísticamente significativas, en función de cada relación C/N ensayada, tanto para los estudios en presencia de oxígeno ( $P < 0.04$ ) como en ausencia ( $P < 0.01$ ).



**Figura 33. Tamaño de la biopelícula (mg/g relleno) en función de la relación C/N. Ensayos realizados con y sin O.D. y empleando sacarosa.**

Tanto para el ensayo con oxígeno como sin el se ajustaban a una regresión lineal (tabla 14), presentando valores de pendiente muy diferentes, que al igual que sucediera con el estudio del tamaño de la biopelícula fue mucho mayor para el proceso con oxígeno.

En la figura 34 se representan gráficamente los valores de recuentos, así como sus ajustes lineales para los dos ensayos. En ellos se observa como la tendencia fue semejante a lo sucedido para el tamaño de la biopelícula. Los valores de recuento de HAO para el estudio sin oxígeno variaban de un valor de  $2.7 \pm 0.4 \cdot 10^8$  ufc/g relleno, que se obtenía en la fase de formación de la biopelícula, hasta  $6.5 \pm 0.46 \cdot 10^8$  para una relación C/N de 2.5. En este caso se observaba un incremento en el número de HAO que duplicaba su valor inicial.

**Tabla 14.- Ajustes lineales obtenido entre el recuento de HAO (ufc/g relleno) y la relación C/N, para los ensayos con sacarosa.**

**Ajuste lineal sin oxígeno  $y = a + bx$**

Variable dependiente: Heterótrofos capaces de crecer sin oxígeno.

Variable independiente: Relación C/N

Parámetro	Estimación	Error estándar	T-estadística	P-valor
<b>Ord. Origen</b>	2.3513e <sup>8</sup>	1.1838e <sup>7</sup>	19.862	< 0.001
<b>Pendiente</b>	3.1316e <sup>8</sup>	6.7195e <sup>6</sup>	4.66044	< 0.04

**Coefficiente de correlación:** 0.790932      **r<sup>2</sup>:** 62.5573 %

**Error estándar de la estimación:** 2.79021e<sup>7</sup>

**Ajuste lineal con oxígeno  $y = a + bx$**

Variable dependiente: Heterótrofos capaces de crecer sin oxígeno

Variable independiente: Relación C/N

Parámetro	Estimación	Error estándar	T-estadística	P-valor
<b>Ord. Origen</b>	1.9131e <sup>8</sup>	2.8314e <sup>7</sup>	6.75692	< 0.001
<b>Pendiente</b>	1.5991e <sup>8</sup>	1.9721e <sup>7</sup>	8.10841	< 0.001

**Coefficiente de correlación:** 0.91374      **r<sup>2</sup>:** 83.4913 %

**Error estándar de la estimación:** 6.54461e<sup>7</sup>

El incremento que se detectaba para los estudios con oxígeno fue inferior, pasando de un valor de 2.66±0.14 ufc/ g relleno en la formación de la biopelícula hasta 3.42±0.17·10<sup>8</sup> ufc/g relleno para una relación C/N de 2.85. Al igual que sucedía para la biopelícula, a mayor dosificación más se separaban las rectas que se obtenían para ambos ensayos.

Estos valores fueron superiores a los obtenidos para el etanol y semejantes a los que se registraban para el metanol.

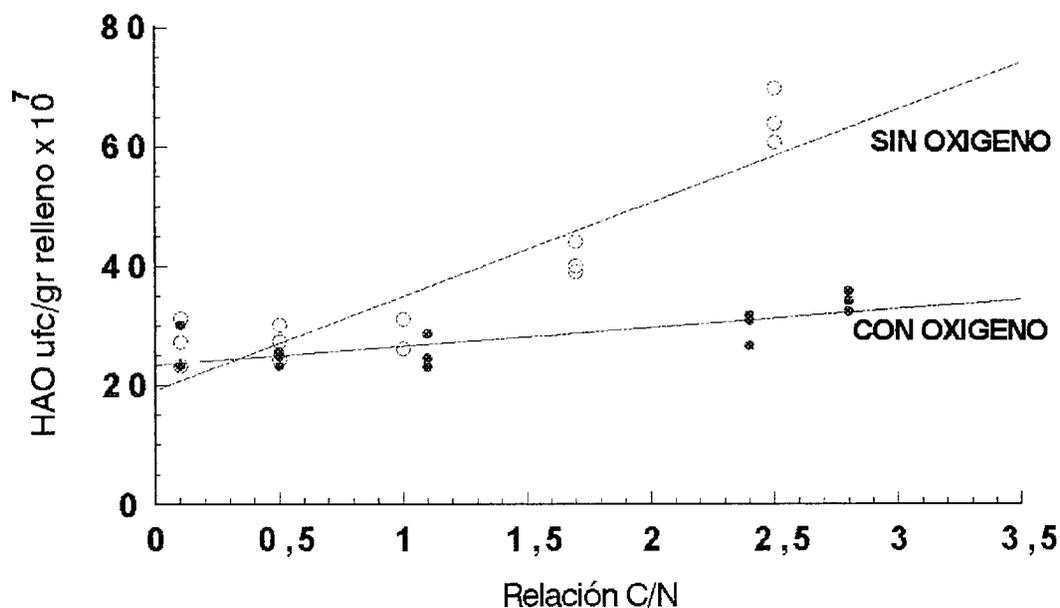


Figura 34. Recuentos de HAO (ufc/g relleno) en función de la relación C/N . Ensayos realizados con y sin O.D. y empleando sacarosa.

### 3,1,3.- Desnitrificantes.

Tanto para el ensayo con oxígeno como en ausencia de el, los recuentos obtenidos para las bacterias desnitrificantes en función de la relación C/N, presentaban valores con diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $P < 0.001$ ). En este estudio se observaba un incremento en la cantidad de bacterias desnitrificantes presentes en la biopelícula ( ufc/g relleno), conforme se incrementaba la dosificación de fuente de carbono, ajustándose los datos obtenidos a una regresión lineal (tabla 15), tanto para el estudio con oxígeno como sin el.

Al igual que para los recuentos de HAO y el tamaño de la biopelícula, se obtenían diferentes valores de pendientes para los estudios con y sin oxígeno, siendo mayor en el ensayo sin oxígeno. Esto implicaba que los recuentos de desnitrificantes, para iguales dosificaciones de sacarosa, eran mayores en el estudio sin oxígeno disuelto en el agua a tratar.

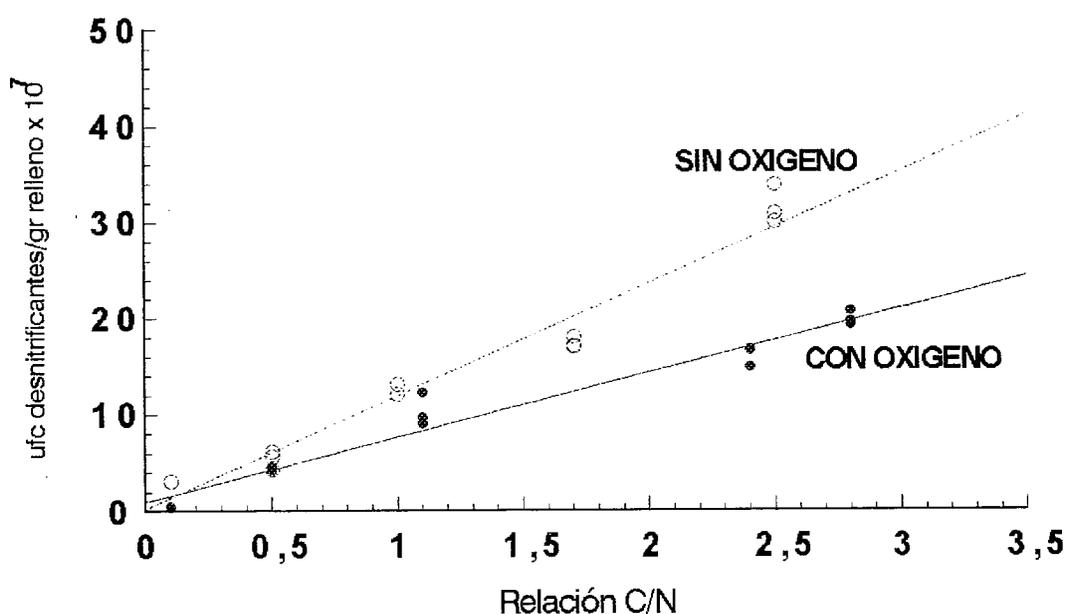
Si se comparaban las pendientes con las que se obtenían para las otras fuentes de carbono ensayadas, estas eran las menores, tanto en los estudios con y sin oxígeno.

En la figura 35 se representan los valores de recuentos de bacterias desnitrificantes y sus ajustes lineales, en función de la relación C/N, tanto para los ensayos con oxígeno disuelto como sin el. Los valores obtenidos para el proceso sin oxígeno fueron mayores que los obtenidos en el ensayo con el, incrementándose, conforme se aumentaba la dosificación de fuente de carbono, la diferencia entre las dos rectas.

**Tabla 15.- Ajustes lineales obtenidos entre los recuentos de desnitrificantes (ufc/g relleno) y la relación C/N, para los ensayos con sacarosa.**

<b>Ajuste lineal sin oxígeno <math>y = a + bx</math></b>				
Variable dependiente: Desnitrificantes.				
Variable independiente: Relación C/N				
<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>T-estadística</b>	<b>P-valor</b>
<b>Ord. Origen</b>	3.4251e <sup>6</sup>	9.1291e <sup>6</sup>	0.37518	<0.05
<b>Pendiente</b>	1.1775e <sup>8</sup>	6.3586e <sup>6</sup>	18.5182	< 0.001
<b>Coefficiente de correlación:</b> 0.98157		<b>r<sup>2</sup>:</b> 96.3475 %		
<b>Error estándar de la estimación:</b> 2.11012e <sup>7</sup>				
<b>Ajuste lineal con oxígeno <math>y = a + bx</math></b>				
Variable dependiente: Desnitrificantes				
Variable independiente: Relación C/N				
<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>T-estadística</b>	<b>P-valor</b>
<b>Ord. Origen</b>	9.3192e <sup>6</sup>	6.2936e <sup>6</sup>	1.48072	< 0.05
<b>Pendiente</b>	6.6385e <sup>7</sup>	3.5723e <sup>6</sup>	18.5833	< 0.001
<b>Coefficiente de correlación:</b> 0.98169		<b>r<sup>2</sup>:</b> 96.3722 %		
<b>Error estándar de la estimación:</b> 1.48337e <sup>7</sup>				

El máximo valor obtenido para los recuentos en ausencia de oxígeno fue de  $3.16 \pm 0.2 \cdot 10^8$  ufc/g relleno para la relación C/N 2.5, con la que se obtenía un 100% de rendimiento. En este ensayo se obtenía un incremento de 10 veces el valor obtenido en la fase de formación de la biopelícula. Este incremento fue mucho mayor para el proceso con oxígeno, el cual pasaba de  $0.036 \pm 0.0049 \cdot 10^8$  ufc/g relleno hasta  $1.99 \pm 0.078 \cdot 10^8$  ufc/g relleno, un valor 66 veces superior al obtenido en la fase de formación de la biopelícula.



**Figura 35.** Recuentos de desnitrificantes (ufc/g relleno) en función de la relación C/N .  
 Ensayos realizados con y sin O.D. y empleando sacarosa.

### 3,1,4.- Reductores de nitrato.

Los valores obtenidos para los recuentos de reductores de nitrato, respecto de cada relación C/N, presentaban diferencias estadísticamente significativas entre ellos, para el ensayo de sacarosa en ausencia de oxígeno ( $P < 0.001$ ). No sucedió lo mismo para el ensayo con oxígeno, para el cual el análisis de varianza no indicaba diferencias significativas entre cada recuento ( $P < 0.95$ ).

En la tabla 16 se representan los ajustes lineales para cada ensayo, observando como el proceso sin oxígeno si se ajustaba a una regresión lineal, pero no sucedía lo mismo para el estudio en presencia de oxígeno.

La tendencia de los recuentos también variaba, siendo esta de crecimiento a mayor dosificación de fuente de carbono en los ensayos sin oxígeno en el agua a tratar, según lo demostraba su pendiente positiva. La pendiente estimada para el proceso con oxígeno era negativa, por lo que a pesar de no ajustarse los valores a una regresión lineal, si se demostraba su tendencia a descender conforme se incrementaba la concentración de fuente de carbono, algo que solo se manifestaba en este ensayo.

**Tabla 16.- Ajustes lineales obtenidos entre los recuentos de reductores de nitrato (ufc/g relleno) y la relación C/N, para los ensayos con sacarosa.**

<b>Ajuste lineal sin oxígeno <math>y = a + bx</math></b>				
Variable dependiente: Reductores de nitrato.				
Variable independiente: Relación C/N				
<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>T-estadística</b>	<b>P-valor</b>
<b>Ord. Origen</b>	5.9453e <sup>7</sup>	8.7174e <sup>6</sup>	6.8201	<0.001
<b>Pendiente</b>	3.8263e <sup>7</sup>	6.0718e <sup>6</sup>	6.30185	< 0.001
<b>Coefficiente de correlación:</b> 0.867976		<b>r<sup>2</sup>:</b> 75.3383 %		
<b>Error estándar de la estimación:</b> 2.01495e <sup>7</sup>				
<b>Ajuste lineal con oxígeno <math>y = a + bx</math></b>				
Variable dependiente: Reductores de nitrato				
Variable independiente: Relación C/N				
<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>T-estadística</b>	<b>P-valor</b>
<b>Ord. Origen</b>	1.8461e <sup>8</sup>	1.1974e <sup>7</sup>	15.4174	< 0.01
<b>Pendiente</b>	-2.066e <sup>7</sup>	6.7965e <sup>6</sup>	-3.04045	< 0.9
<b>Coefficiente de correlación:</b> -0.644657		<b>r<sup>2</sup>:</b> 41.5582 %		
<b>Error estándar de la estimación:</b> 2.8222e <sup>7</sup>				

En la figura 36 se representan los recuentos obtenidos para los reductores de nitrato en presencia y ausencia de oxígeno en el agua a tratar. Hay que destacar la diferencia de valores que se obtenían para los recuentos a bajas concentraciones de fuente de carbono, siendo este muy superior en el caso del ensayo con oxígeno, que alcanzaba un valor de  $1.57 \pm 0.31 \cdot 10^8$  ufc/g relleno, frente a  $0.43 \pm 0.06 \cdot 10^8$  ufc/g relleno, un valor casi cuatro veces inferior. Para estos estudios con oxígeno se observó una tendencia descendente de los valores, totalmente al contrario que para el ensayo sin oxígeno en el cual los recuentos aumentaban.

Debido a estas diferentes tendencias y a los diferentes recuentos obtenidos para bajas concentraciones de sacarosa, los recuento para altas relaciones C/N se fueron aproximando, alcanzando un valor de  $1.5 \pm 0.17 \cdot 10^8$  ufc/g relleno para una relación C/N de 2.5 en los estudios sin oxígeno y de  $1.1 \pm 0.035 \cdot 10^8$  ufc/g relleno para una relación de 2.85 en el ensayo con oxígeno.

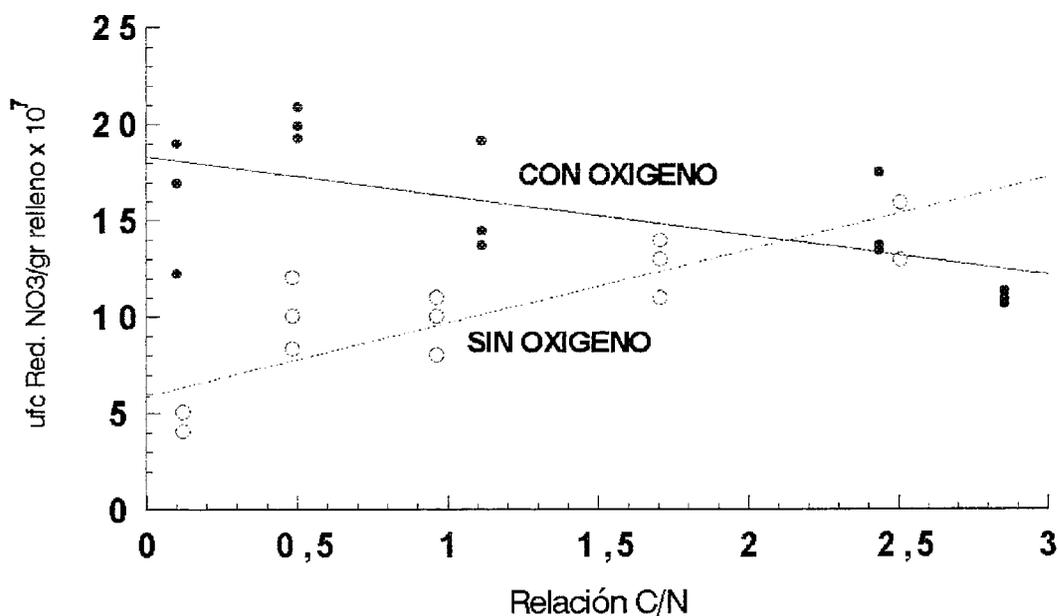


Figura 36. Recuentos de reductores de nitrato (ufc/g relleno) en función de la relación C/N. Ensayos realizados con y sin O.D. y empleando sacarosa.

**3,1,5.- Matriz de correlación**

Para cada uno de los ensayos realizados se obtuvo una matriz de correlación (tabla 17 y 18) entre las comunidades bacterianas estudiadas, el tamaño de la biopelícula, el rendimiento del sistema en eliminación de nitrógeno, la presencia de nitrato, nitrito y fuente de carbono en la salida, así como la relación C/N.

**Tabla 17. Coeficientes de correlación obtenidos para el ensayo con sacarosa sin O.D.: C/N: Relación C/N; REND: Rendimiento en eliminación de N; NO<sub>3</sub>Sal: Nitrato en la salida; NO<sub>2</sub>Sal: Nitrito en la salida; Csal: Carbono en la salida; Bio: Biopelícula; HAO: Heterótrofos capaces de crecer sin oxígeno; Des: Desnitrificantes; Red: Reductores de nitrato.**

	C/N	REND	NO <sub>3</sub> Sal	NO <sub>2</sub> Sal	Csal	Bio	HAO	Des	Red
C/N	1.00								
REND	0.993	1.00							
NO <sub>3</sub> Sal	-0.984	-0.997	1.00						
NO <sub>2</sub> Sal	-0.094	-0.128	-0.061	1.00					
Csal	0.031	0.112	-0.169	0.840	1.00				
Bio	0.985	0.983	-0.980	-0.008	0.111	1.00			
HAO	0.914	0.888	-0.857	-0.375	-0.103	0.876	1.00		
Des	0.982	0.978	-0.967	-0.104	0.104	0.969	0.937	1.00	
Red	0.868	0.863	-0.862	-0.023	-0.054	0.826	0.744	0.838	1.00

**Tabla 18. Coeficientes de correlación obtenidos para el ensayo con sacarosa y con O.D.: C/N: Relación C/N; REND: Rendimiento en eliminación de N; NO<sub>3</sub>Sal: Nitrato en la salida; NO<sub>2</sub>Sal: Nitrito en la salida; Csal: Carbono en la salida; Bio: Biopelícula; HAO: Heterótrofos capaces de crecer sin oxígeno; Des: Desnitrificantes; Red: Reductores de nitrato.**

	C/N	REND	NO <sub>3</sub> Sal	NO <sub>2</sub> Sal	Csal	Bio	HAO	Des	Red
C/N	1.00								
REND	0.986	1.00							
NO <sub>3</sub> Sal	-0.931	-0.974	1.00						
NO <sub>2</sub> Sal	-0.142	-0.2	-0.21	1.00					
Csal	0.703	0.728	-0.729	0.100	1.00				
Bio	0.991	0.962	-0.883	-0.25	0.659	1.00			
HAO	0.791	0.713	-0.614	-0.347	0.518	0.811	1.00		
Des	0.934	0.926	-0.896	-0.053	0.672	0.925	0.783	1.00	
Red	-0.644	-0.591	0.52	0.178	-0.527	-0.638	-0.606	-0.488	1.00

Atendiendo a los coeficientes de correlación obtenidos se observaba que, a excepción de las bacterias reductoras de nitrato, en el estudio con oxígeno en el agua a tratar, para el resto de las comunidades bacterianas había una alta correlación con la relación C/N. Igualmente sucedía con el rendimiento en eliminación de nitrato del agua a tratar, destacando sobre todo las correlaciones obtenidas con las bacterias desnitrificantes con valores más próximos a la unidad, tanto en el proceso con oxígeno como sin el.

El tamaño de la biopelícula estaba también fuertemente correlacionado con la relación C/N para el que se obtenían valores más altos que para las comunidades microbianas estudiadas.

También se correlacionaba con estas comunidades bacterianas, a excepción nuevamente de los reductores de nitrato en presencia de oxígeno. Destacaban nuevamente las correlaciones entre biopelícula y desnitrificantes

Parámetros como la concentración de nitrito y sacarosa en el agua de salida no presentaban coeficientes de correlación muy significativos con el resto de los parámetros. Justo lo contrario sucedía con la concentración de nitrato en la salida, para el cual se obtenían coeficientes con signo negativo, siendo más significativos los obtenidos con los recuentos de bacterias desnitrificantes y biopelícula tanto en presencia como en ausencia de oxígeno disuelto en el agua a tratar.

Dentro de los coeficientes de correlación calculados para cada comunidad microbiana, los más significativos fueron los obtenidos entre los desnitrificantes y los heterótrofos capaces de crecer sin oxígeno, tanto en los ensayos con oxígeno como sin el.

### **3.2.- METANOL**

#### **3.2.1.- Tamaño de la biopelícula.**

Los valores obtenidos para el tamaño de la biopelícula en función de la relación C/N ensayada presentaban diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.001$ ) entre ellos, tanto para los estudios realizados en presencia como en ausencia de oxígeno. En ambos casos la biopelícula incrementaba su tamaño al aumentar la dosificación de metanol, ajustándose los datos a una regresión lineal, tal como se aprecia en la tabla 19.

Al igual que lo sucedido para los ensayos con sacarosa, el crecimiento de la biopelícula fue mayor para los ensayos en ausencia de oxígeno en el agua a tratar, tal como se refleja en las pendientes obtenidas en el ajuste lineal. Si comparamos estas pendientes, con las obtenidas para los ensayos con otras fuentes de carbono, fuero, tanto en el ensayo con oxígeno como sin el,

inferiores a las obtenidas para la sacarosa. Para el ensayo con oxígeno la diferencia no fue tan acusada, observándose sin embargo que su valor era más alto que el del etanol, al contrario de lo que se apreciaba en los estudios sin oxígeno.

**Tabla 19.- Ajustes lineales obtenido entre el tamaño de la biopelícula y la relación C/N, para los ensayos con metanol.**

**Ajuste lineal sin oxígeno  $y = a + bx$**

Variable dependiente: Tamaño de la biopelícula

Variable independiente: Relación C/N

Parámetro	Estimación	Error estándar	T-estadística	P-valor
<b>Ord. Origen</b>	12.08	0.552134	21.8788	< 0.001
<b>Pendiente</b>	12.3382	0.758067	16.2759	< 0.001
<b>Coefficiente de correlación:</b> 0.981643		<b>r<sup>2</sup>:</b> 96.3624 %		
<b>Error estándar de la estimación:</b> 1.03292				

**Ajuste lineal con oxígeno  $y = a + bx$**

Variable dependiente: Tamaño de la biopelícula

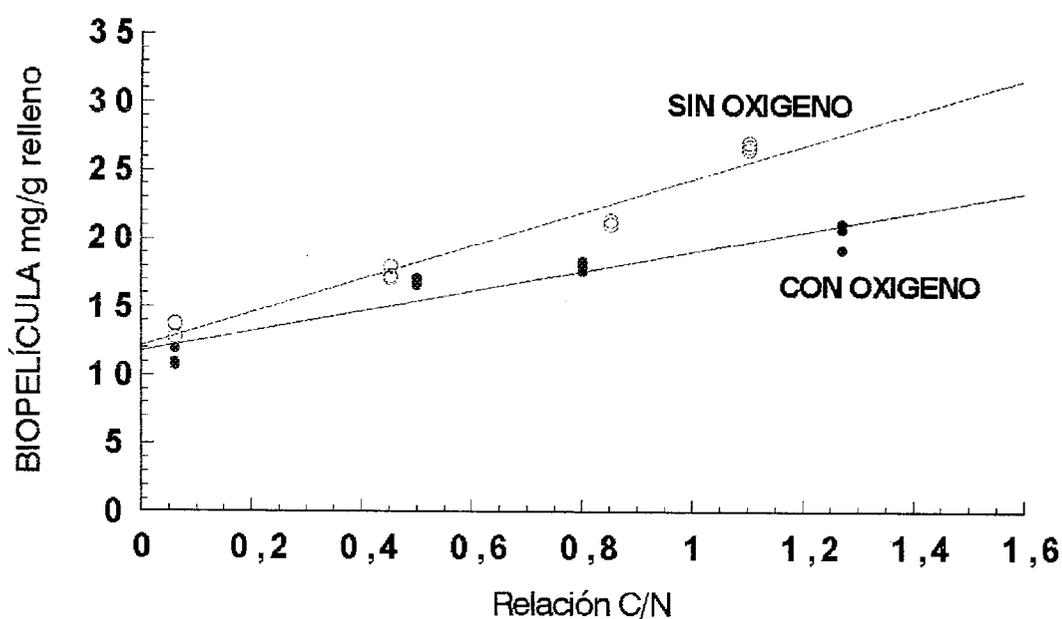
Variable independiente: Relación C/N

Parámetro	Estimación	Error estándar	T-estadística	P-valor
<b>Ord. Origen</b>	11.7365	0.634272	18.504	< 0.001
<b>Pendiente</b>	7.34238	0.801157	9.16473	< 0.001
<b>Coefficiente de correlación:</b> 0.945309		<b>r<sup>2</sup>:</b> 89.3608 %		
<b>Error estándar de la estimación:</b> 1.21869				

En la figura 37 se representan los valores de tamaño de biopelícula así como sus ajustes lineales, tanto en anoxia como con oxígeno disuelto en el agua a tratar. El máximo valor de biopelícula alcanzado en el ensayo con oxígeno fue de  $20.33 \pm 1.01$  mg/g relleno, para una relación C/N de 1.27 con la que se eliminaba completamente el nitrato del agua de entrada. Teniendo en cuenta que la biopelícula en la fase de formación alcanzaba un peso seco de  $11.15 \pm 0.65$  mg/g

relleno, suponía un crecimiento de 1.8 veces el tamaño inicial, crecimiento inferior al obtenido para la sacarosa.

En los ensayos sin oxígeno el valor crecía desde  $13.34 \pm 0.57$  mg/g relleno en la formación de la biopelícula, hasta  $26.72 \pm 0.25$  mg/g relleno, para una relación C/N de 1.1. En este caso el incremento fue del doble, algo superior al del ensayo con oxígeno y muy inferior al obtenido para la sacarosa.



**Figura 37.** *Tamaño de la biopelícula (mg/g relleno) en función de la relación C/N. Ensayos realizados con y sin O.D. y empleando metanol.*

### 3,2,2.- Heterótrofos capaces de crecer en ausencia de oxígeno (HAO).

Los valores obtenidos para los recuentos de HAO en función de la relación C/N, presentaban diferencias estadísticamente significativas entre ellos, tanto para el estudio realizado en presencia de oxígeno ( $P < 0.001$ ), como para el realizado en ausencia ( $P < 0.05$ ).

Para ambos ensayos se observaba una correlación entre los recuentos de HAO y la relación C/N, ajustándose los datos a una regresión lineal, tal como se puede apreciar en la tabla 20. La pendiente de la recta obtenida fue superior para los estudios sin oxígeno que para los realizados en presencia de el, tal y como sucedía en los ensayos realizados con sacarosa y etanol. Los valores de las pendientes fueron semejantes a los obtenidos con la sacarosa, observándose una tendencia ascendente muy parecida, a pesar del diferente incremento del tamaño de la biopelícula.

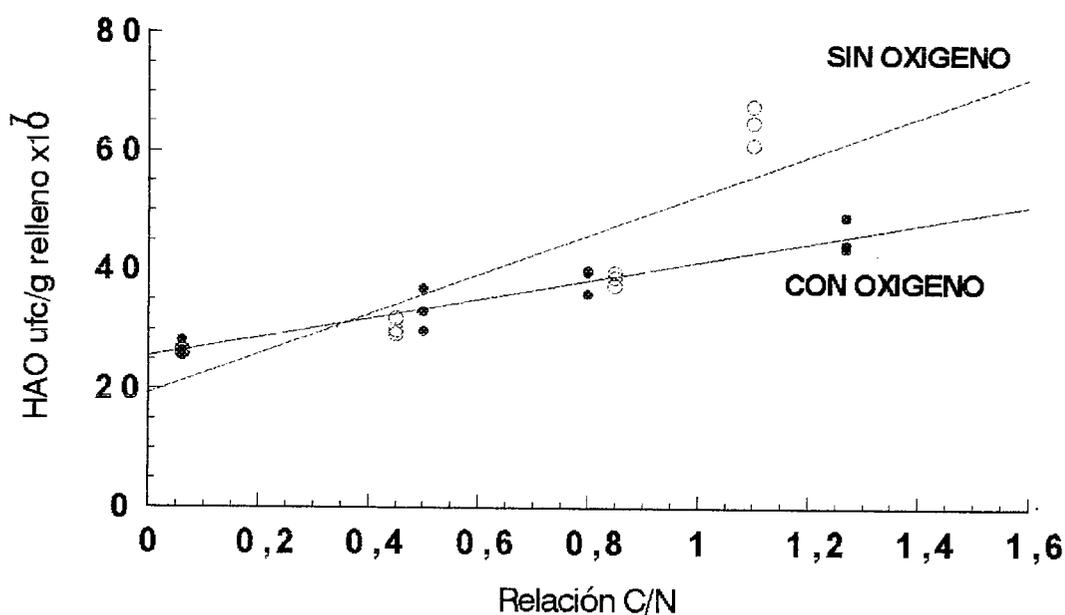
**Tabla 20.- Ajustes lineales obtenidos entre los recuentos de HAO (ufc/g relleno) y la relación C/N, para los ensayos con metanol.**

<b>Ajuste lineal sin oxígeno <math>y = a + bx</math></b>				
Variable dependiente: Heterótrofos capaces de crecer sin oxígeno.				
Variable independiente: Relación C/N				
<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>T-estadística</b>	<b>P-valor</b>
<b>Ord. Origen</b>	1.91745e <sup>8</sup>	4.1360e <sup>7</sup>	4.63596	< 0.05
<b>Pendiente</b>	3.3674e <sup>8</sup>	5.6787e <sup>7</sup>	5.92988	< 0.05
<b>Coefficiente de correlación:</b> 0.882373		<b>r<sup>2</sup>:</b> 77.8582 %		
<b>Error estándar de la estimación:</b> 7.73762e <sup>7</sup>				
<b>Ajuste lineal con oxígeno <math>y = a + bx</math></b>				
Variable dependiente: Heterótrofos capaces de crecer sin oxígeno				
Variable independiente: Relación C/N				
<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>T-estadística</b>	<b>P-valor</b>
<b>Ord. Origen</b>	2.5504e <sup>8</sup>	1.2343e <sup>7</sup>	20.6633	< 0.001
<b>Pendiente</b>	1.5995e <sup>8</sup>	1.5591e <sup>7</sup>	10.9524	< 0.001
<b>Coefficiente de correlación:</b> 0.955634		<b>r<sup>2</sup>:</b> 91.3237 %		
<b>Error estándar de la estimación:</b> 2.37162e <sup>7</sup>				

En la figura 38 se representan gráficamente los valores obtenidos para cada recuento y sus ajustes lineales. Para estos ensayos se observaba una tendencia ascendente tanto en presencia

como en ausencia de oxígeno. En el estudio en anoxia se registraba un crecimiento desde  $2.61 \pm 0.03 \cdot 10^8$  ufc/g relleno para una relación C/N de 0.062 que crecía conforme se aumentaba la dosificación de carbono hasta un valor máximo de  $6.45 \pm 0.34 \cdot 10^8$  ufc/g relleno para la relación C/N 1.1 con la que se eliminaba el 100% del nitrógeno presente en el agua de entrada. Esto suponía un crecimiento de 2.5 veces el valor inicial, prácticamente lo mismo que se obtenía para la sacarosa.

El comportamiento del sistema para los estudios en presencia de oxígeno presentaba igualmente un incremento en los recuento parecido igualmente al que se obtenía para la sacarosa. En este caso se pasaba de un recuento de  $2.66 \pm 0.14 \cdot 10^8$  ufc/g relleno para una relación C/N de 0.065 hasta un valor de  $4.57 \pm 0.29 \cdot 10^8$  ufc/g relleno para la relación C/N 1.27, lo que suponía un crecimiento de 1.8.



**Figura 38.** Recuentos de HAO (ufc/g relleno) en función de la relación C/N. Ensayos realizados con y sin O.D. y empleando metanol.

### 3,2,3.- Desnitrificantes.

Los valores que se obtenían para los recuentos de bacterias desnitrificantes, en función de la relación C/N ensayada, presentaban diferencias estadísticamente significativas entre ellos, tanto en el ensayo con oxígeno en el agua a tratar ( $P < 0.001$ ) como el que se realizó en ausencia de oxígeno ( $P < 0.05$ ).

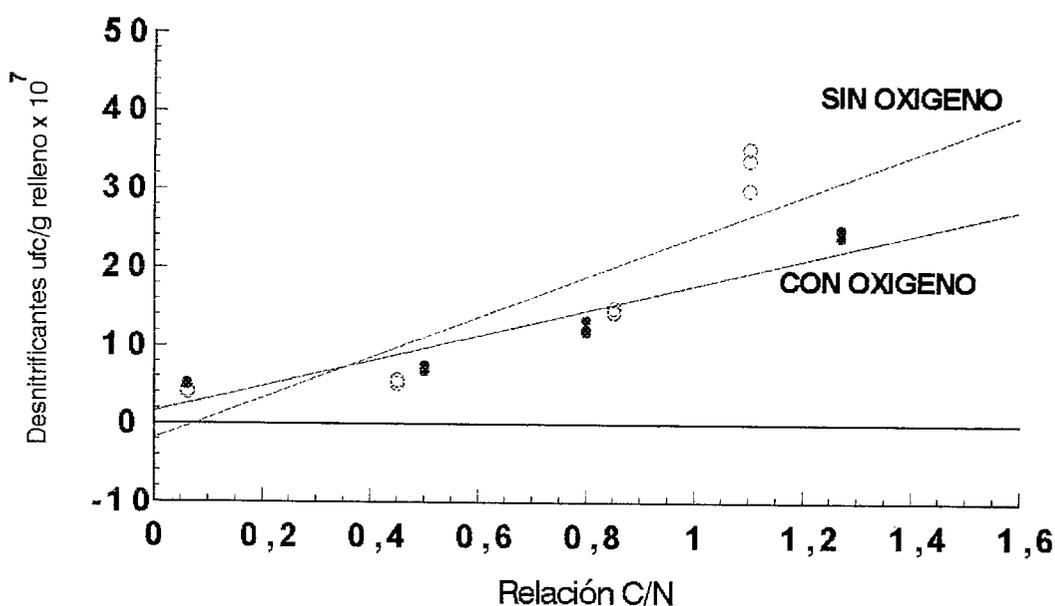
**Tabla 21.- Ajustes lineales obtenidos entre los recuentos de desnitrificantes (ufc/g relleno) y la relación C/N, para los ensayos con metanol.**

<b>Ajuste lineal sin oxígeno <math>y = a + bx</math></b>				
Variable dependiente: Desnitrificantes.				
Variable independiente: Relación C/N				
<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>T-estadística</b>	<b>P-valor</b>
<b>Ord. Origen</b>	-1.9833e <sup>7</sup>	3.1079e <sup>7</sup>	-0.6381	<0.05
<b>Pendiente</b>	2.6246e <sup>8</sup>	4.2671e <sup>7</sup>	6.15082	< 0.05
<b>Coefficiente de correlación:</b> 0.88935		<b>r<sup>2</sup>:</b> 79.0938 %		
<b>Error estándar de la estimación:</b> 5.81433e <sup>7</sup>				
<b>Ajuste lineal con oxígeno <math>y = a + bx</math></b>				
Variable dependiente: Desnitrificantes				
Variable independiente: Relación C/N				
<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>T-estadística</b>	<b>P-valor</b>
<b>Ord. Origen</b>	1.4559e <sup>7</sup>	1.3951e <sup>7</sup>	1.04363	< 0.05
<b>Pendiente</b>	1.6374e <sup>8</sup>	1.7621e <sup>7</sup>	9.29198	< 0.001
<b>Coefficiente de correlación:</b> 0.94668		<b>r<sup>2</sup>:</b> 89.6202 %		
<b>Error estándar de la estimación:</b> 2.68059e <sup>7</sup>				

Los datos obtenidos en los dos ensayos se ajustaban perfectamente a una regresión lineal, tal como aparece en el ajuste lineal mostrado en la tabla 21. La pendiente de la recta obtenida variaba dependiendo de la presencia de oxígeno, siendo esta mayor en los estudios realizados en

anoxia. En cuanto a los valores de la pendiente hay que indicar que fueron superiores a los obtenidos para los dos ensayos con sacarosa, destacando especialmente los ensayos sin oxígeno que presentaban la mayor pendiente obtenida, de los seis ensayos realizados.

La tendencia de los valores fue ascendente en los dos casos, incrementándose el número de bacterias desnitrificantes en la biopelícula conforme se aumentaba la dosificación de metanol. El crecimiento bacteriano fue para estos ensayos mayor que el que se producía en los ensayos con sacarosa.



**Figura 39.** Recuentos de desnitrificantes (ufc/g relleno) en función de la relación C/N. Ensayos realizados con y sin O.D. y empleando metanol.

En la figura 39 se representan los valores obtenidos para los recuentos de bacterias desnitrificantes y sus ajustes lineales. El máximo valor que se obtenía, para los recuentos en ausencia de oxígeno, fue de  $3.28 \pm 0.27 \cdot 10^8$  ufc/ g relleno para una relación C/N de 1.1. Este valor fue semejante al obtenido para la sacarosa y el etanol en iguales condiciones de rendimiento. Los crecimientos experimentados fueron también semejantes, oscilando en torno a 10 veces su valor

inicial.

El valor obtenido en presencia de oxígeno fue menor, alcanzando un recuento de  $2.45 \pm 0.056 \cdot 10^8$  ufc/ g relleno para obtener igual rendimiento, pero con mayor dosificación de fuente de carbono. Este valor fue semejante al obtenido para iguales condiciones de trabajo con el etanol y sacarosa, sin embargo el incremento experimentado fue menor, al tener un mayor número de bacterias desnitrificantes en la fase de formación.

### **3,2,4.- Reductores de nitrato.**

Al igual que para la sacarosa los valores obtenidos para los recuentos de reductores de nitrato presentaban valores diferentes al comportamiento general de los otros grupos microbianos ensayados.

Los recuentos obtenidos para cada relación C/N, presentaban diferencias estadísticamente significativas entre ellos, tanto en el ensayo en ausencia de oxígeno ( $P < 0.05$ ), como para el ensayo con oxígeno ( $P < 0.001$ ). Para este estudio se observaba una correlación entre los recuentos y la relación C/N, ajustándose los valores obtenidos, tanto en presencia como en ausencia de oxígeno disuelto, a una regresión lineal (tabla 22). Las pendientes de la recta obtenidas presentaban valores diferentes a los obtenidos para las otras comunidades estudiadas. En este caso la pendiente de mayor valor era la obtenida en el proceso con oxígeno.

En la figura 40 se representan los recuentos y sus ajustes lineales, obtenidos para los reductores de nitrato en presencia y ausencia de oxígeno en el agua a tratar. A diferencia de lo obtenido en los estudios con sacarosa, para el metanol existía una tendencia ascendente de las bacterias reductoras de nitrato conforme se incrementaba la fuente de carbono, independientemente de la presencia o no de oxígeno en el agua a tratar.

Para el ensayo con oxígeno, los valores variaban desde  $0.76 \pm 0.04 \cdot 10^8$  ufc/ g relleno para

una relación C/N 0.065 hasta  $1.37 \pm 0.025 \cdot 10^8$  ufc/g relleno para una relación C/N de 1.27, valor que suponía casi el doble que el inicial.

**Tabla 22.- Ajustes lineales obtenidos entre los recuentos de reductores de nitrato (ufc/g relleno) y la relación C/N, para los ensayos con metanol.**

**Ajuste lineal sin oxígeno  $y = a + bx$**

Variable dependiente: Reductores de nitrato.

Variable independiente: Relación C/N

<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>T-estadística</b>	<b>P-valor</b>
<b>Ord. Origen</b>	$4.1844e^7$	$3.5060e^6$	11.9349	<0.001
<b>Pendiente</b>	$3.4593e^7$	$4.8137e^6$	7.18642	< 0.001
<b>Coefficiente de correlación:</b> 0.915303		<b>r<sup>2</sup>:</b> 83.778 %		
<b>Error estándar de la estimación:</b> $6.55903e^6$				

**Ajuste lineal con oxígeno  $y = a + bx$**

Variable dependiente: Reductores de nitrato

Variable independiente: Relación C/N

<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>T-estadística</b>	<b>P-valor</b>
<b>Ord. Origen</b>	$7.4118e^7$	$2.18644e^6$	33.899	< 0.001
<b>Pendiente</b>	$5.0548e^7$	$2.7617e^6$	18.3032	< 0.001
<b>Coefficiente de correlación:</b> 0.985401		<b>r<sup>2</sup>:</b> 97.1015 %		
<b>Error estándar de la estimación:</b> $4.2010e^6$				

En el ensayo sin oxígeno el incremento fue semejante, aunque los valores de los recuentos eran inferiores, variando desde  $0.39 \pm 0.02 \cdot 10^8$  ufc/g relleno para una relación C/N 0.062 hasta  $0.77 \pm 0.037 \cdot 10^8$  ufc/g relleno para una relación C/N de 1.1.

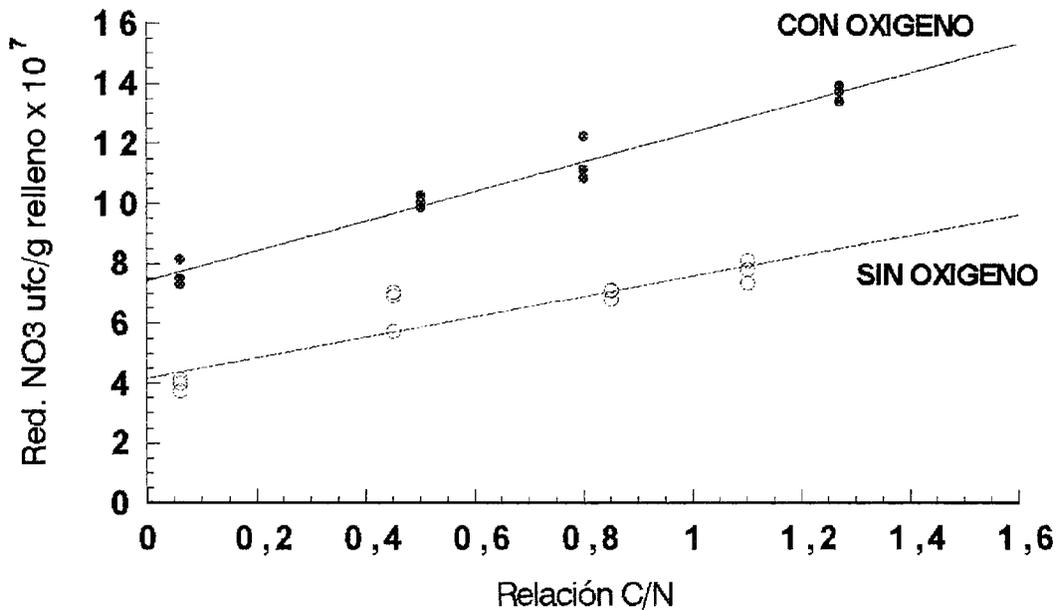


Figura 40. Recuentos de reductores de nitrato (ufc/g relleno) en función de la relación C/N . Ensayos realizados con y sin O.D. y empleando metanol.

### 3,2,5.- Matriz de correlación

Los datos obtenidos en los recuentos de HAO, desnitrificantes y reductores de nitrato estaban altamente correlacionados con la relación C/N, tanto para el ensayo con oxígeno (tabla 24) como sin el (tabla 23), siendo esta correlación más acentuada en el estudio con oxígeno. Iguales correlaciones se encontraban con respecto a los valores de rendimiento en la eliminación de nitrógeno del agua de entrada y con las concentraciones de nitrato en el agua de salida.

El tamaño de la biopelícula estaba también altamente correlacionado con la relación C/N las comunidades microbianas estudiadas, el rendimiento y la concentración de nitrato en el agua de salida.

Al igual que sucedió con la sacarosa, los valores de concentración de nitrito en el agua de salida no se correlacionaban con ningún otro parámetro de los ensayados.

**Tabla 23. Coeficientes de correlación obtenidos para el ensayo con metanol y sin O.D. C/N: Relación C/N; REND: Rendimiento en eliminación de N; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>Sal: Nitrato en la salida; NO<sub>2</sub><sup>-</sup>Sal: Nitrito en la salida; Csal: Carbono en la salida; Bio: Biopelícula; HAO: Heterótrofos capaces de crecer sin oxígeno; Des: Desnitrificantes; Red: Reductores de nitrato.**

	C/N	REND	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Sal	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> Sal	Csal	Bio	HAO	Des	Red
C/N	1.00								
REND	0.991	1.00							
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Sal	-0.988	-0.998	1.00						
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> Sal	0.272	0.287	-0.334	1.00					
Csal	0.867	0.876	-0.857	-0.159	1.00				
Bio	0.981	0.976	-0.968	0.115	0.936	1.00			
HAO	0.882	0.896	-0.879	-0.124	0.990	0.946	1.00		
Des	0.890	0.911	-0.898	-0.059	0.979	0.947	0.993	1.00	
Red	0.915	0.873	-0.866	0.236	0.719	0.879	0.738	0.714	1.00

En lo que respecta a la concentración de fuente de carbono en la salida, esta aparecía muy correlacionada con la relación C/N, al igual que con el resto de parámetros correlacionados con esta.

En este caso las tres comunidades bacterianas estudiadas se correlacionaban entre si, siendo menos significativos los coeficientes obtenidos para los reductores de nitrato respecto a los desnitrificantes y HAO en los ensayos realizados sin oxígeno.

**Tabla 24. Coeficientes de correlación obtenidos para el ensayo con metanol y con O.D. C/N: Relación C/N; REND: Rendimiento en eliminación de N; NO<sub>3</sub>-Sal: Nitrato en la salida; NO<sub>2</sub>-Sal: Nitrito en la salida; Csal: Carbono en la salida; Bio: Biopelícula; HAO: Heterótrofos capaces de crecer sin oxígeno; Des: Desnitrificantes; Red: Reductores de nitrato.**

	C/N	REND	NO <sub>3</sub> -Sal	NO <sub>2</sub> -Sal	Csal	Bio	HAO	Des	Red
C/N	1.00								
REND	0.994	1.00							
NO <sub>3</sub> -Sal	-0.997	-0.993	1.00						
NO <sub>2</sub> -Sal	-0.013	-0.039	0.016	1.00					
Csal	0.825	0.849	-0.807	-0.236	1.00				
Bio	0.945	0.916	-0.946	-0.007	0.666	1.00			
HAO	0.955	0.952	-0.953	-0.068	0.744	0.914	1.00		
Des	0.946	0.963	-0.934	-0.047	0.920	0.810	0.901	1.00	
Red	0.985	0.974	-0.977	-0.056	0.806	0.940	0.948	0.915	1.00

### 3,3.- ETANOL

#### 3,3,1.- Tamaño de la biopelícula.

Los valores de tamaño de biopelícula aumentaban conforme se incrementaba la dosificación de fuente de carbono al igual que sucedió para el metanol y la sacarosa. Este

incremento se observaba tanto para los estudios con oxígeno disuelto en el agua a tratar como sin el, siendo mayores para los ensayos sin oxígeno (figura 41).

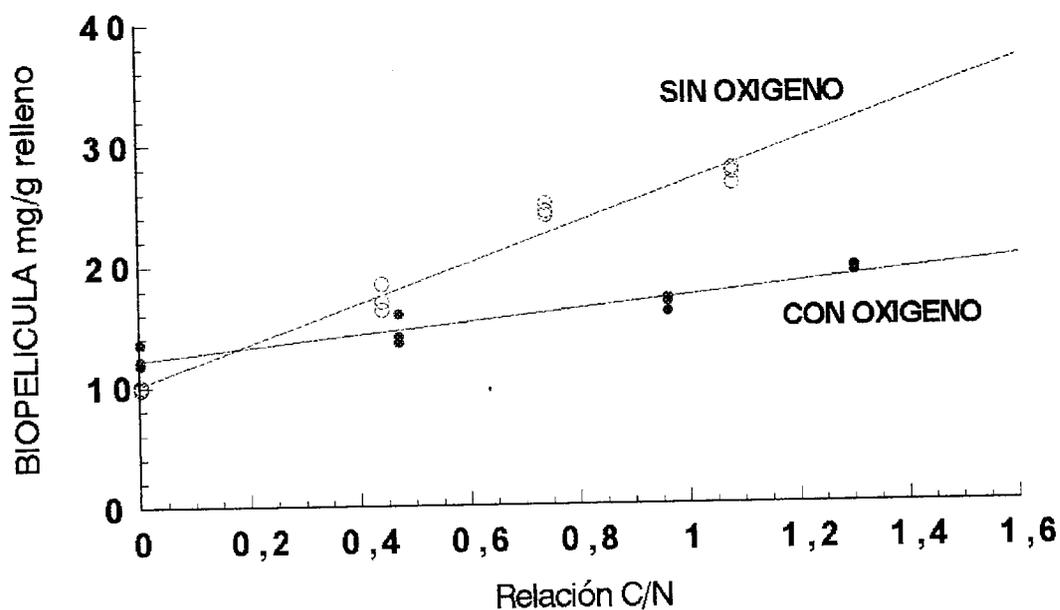
Los valores del tamaño de la biopelícula obtenidos para cada relación C/N, tanto en presencia como en ausencia de oxígeno, presentaban diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $P < 0.001$ ). En la tabla 25 se reflejan los ajustes lineales realizados, observándose como ambos se ajustaban a una regresión lineal, con diferencias en cuanto al valor de la pendiente obtenida.

**Tabla 25.- Ajustes lineales obtenidos entre el tamaño de la biopelícula y la relación C/N, para los ensayos con etanol.**

<b>Ajuste lineal sin oxígeno <math>y = a + bx</math></b>				
Variable dependiente: Tamaño de la biopelícula				
Variable independiente: Relación C/N				
<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>T-estadística</b>	<b>P-valor</b>
<b>Ord. Origen</b>	10.175	0.67623	15.0468	< 0.001
<b>Pendiente</b>	16.7993	0.97921	17.1559	< 0.001
<b>Coefficiente de correlación:</b> 0.983433		<b><math>r^2</math>:</b> 96.7144 %		
<b>Error estándar de la estimación:</b> 1.34694				
<b>Ajuste lineal con oxígeno <math>y = a + bx</math></b>				
Variable dependiente: Tamaño de la biopelícula				
Variable independiente: Relación C/N				
<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>T-estadística</b>	<b>P-valor</b>
<b>Ord. Origen</b>	12.2071	0.430871	28.3312	< 0.001
<b>Pendiente</b>	5.20691	0.512027	10.1692	< 0.001
<b>Coefficiente de correlación:</b> 0.954896		<b><math>r^2</math>:</b> 91.1827 %		
<b>Error estándar de la estimación:</b> 0.873125				

La pendiente de la recta obtenida para el proceso sin oxígeno, fue superior a la obtenida para el metanol, aunque se asemejaba más a este que al obtenido para la sacarosa, proceso que manifestaba el mayor crecimiento de biopelícula. Por otro lado, para el proceso con oxígeno, la pendiente obtenida fue la menor de todos los ensayos, volviendo a ser la sacarosa la que presentaba el mayor incremento.

El máximo valor alcanzado por la biopelícula para los estudios en ausencia de oxígeno fue de  $27.2 \pm 0.66$  mg/g relleno. Este valor fue muy inferior al registrado para los estudios con sacarosa, y semejante al obtenido para el metanol, consiguiendo en los tres casos eliminar el 100% del nitrógeno presente en el agua de entrada. Es crecimiento experimentado fue de 2.8 veces el valor de biopelícula que se obtenía en la fase de formación de esta.



**Figura 41. Tamaño de la biopelícula (mg/g relleno) en función de la relación C/N. Ensayos realizados con y sin O.D. y empleando etanol.**

Para los estudios en presencia de oxígeno el máximo valor, obtenido igualmente para un 100% de rendimiento del sistema, fue muy semejante al metanol, alcanzando el valor de  $19.46 \pm 0.24$  mg/g relleno. El crecimiento experimentado por la biopelícula en esta fase fue el menor de todos suponiendo solo 1.5 veces por encima del valor de formación de la biopelícula.

**3,3,2.- Heterótrofos capaces de crecer en ausencia de oxígeno (HAO).**

Los recuentos de HAO obtenidos para el etanol presentaban un incremento conforme se aumentaba la dosificación de fuente de carbono, al igual que lo sucedido en los ensayos con otras fuentes de carbono. Los diferentes valores obtenidos para cada relación C/N presentaban diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.001$ ) tanto para los ensayos con y sin oxígeno.

**Tabla 26.- Ajustes lineales obtenidos entre los recuentos de HAO (ufc/g relleno) y la relación C/N, para los ensayos con etanol.**

**Ajuste lineal sin oxígeno  $y = a + bx$**

Variable dependiente: Heterótrofos capaces de crecer sin oxígeno.

Variable independiente: Relación C/N

Parámetro	Estimación	Error estándar	T-estadística	P-valor
<b>Ord. Origen</b>	$2.6917e^8$	$1.2662e^7$	21.2571	< 0.001
<b>Pendiente</b>	$1.9821e^8$	$1.8336e^7$	10.8102	< 0.001

**Coefficiente de correlación:** 0.959777      **r<sup>2</sup>:** 92.1173 %

**Error estándar de la estimación:**  $2.52222e^7$

**Ajuste lineal con oxígeno  $y = a + bx$**

Variable dependiente: Heterótrofos capaces de crecer sin oxígeno

Variable independiente: Relación C/N

Parámetro	Estimación	Error estándar	T-estadística	P-valor
<b>Ord. Origen</b>	$2.1526e^8$	$8.4522e^6$	25.4681	< 0.001
<b>Pendiente</b>	$1.2441e^8$	$1.0044e^7$	12.3852	< 0.001

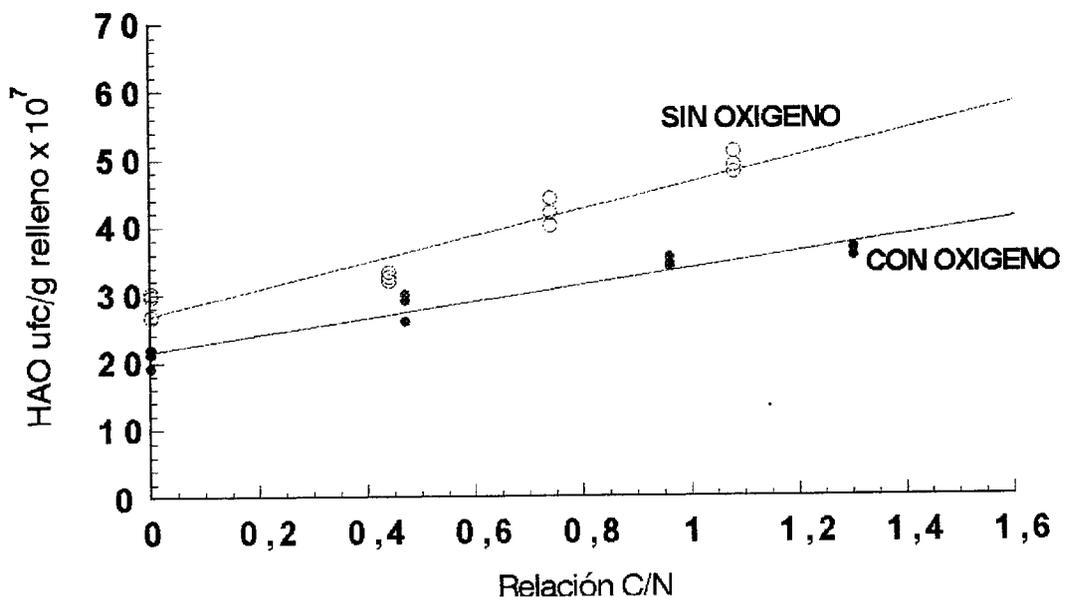
**Coefficiente de correlación:** 0.968916      **r<sup>2</sup>:** 93.8798 %

**Error estándar de la estimación:**  $1.71279e^7$

En la tabla 26 se representan los ajustes lineales obtenidos para cada caso. Los valores de pendiente seguían la misma tendencia que para el resto de comunidades bacterianas ensayadas, obteniéndose un mayor valor para los procesos sin oxígeno.

Los valores de pendiente de la recta fueron los más bajos de las tres fuentes de carbono ensayadas, al igual que sucedía con el tamaño de la biopelícula.

En la figura 42 se representan los valores de los recuentos y sus ajuste lineales, tanto para el proceso con oxígeno como sin el. El mayor crecimiento se manifestó para el proceso sin oxígeno que pasaba desde  $2.86 \pm 0.18 \cdot 10^8$  ufc/g relleno, en la fase de formación de la biopelícula hasta  $4.93 \pm 0.15 \cdot 10^8$  ufc/g relleno para una relación C/N de 1.08. Este incremento fue menor en los ensayos con oxígeno que variaba desde  $2.06 \pm 0.14 \cdot 10^8$  ufc/g relleno hasta  $3.64 \pm 0.075 \cdot 10^8$  ufc/g relleno para la relación C/N 1.3.



**Figura 42.** Recuentos de HAO (ufc/g relleno) en función de la relación C/N. Ensayos realizados con y sin O.D. y empleando etanol.

### 3,3,3.- Desnitrificantes.

Los recuentos obtenidos para los desnitrificantes presentaban igualmente un incremento, conforme se aumentaba la dosificación de etanol. Los valores obtenidos para cada relación C/N, tanto en el proceso con oxígeno como sin el, presentaban diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.001$ ), ajustándose perfectamente a una regresión lineal, tal como se refleja en la tabla 27.

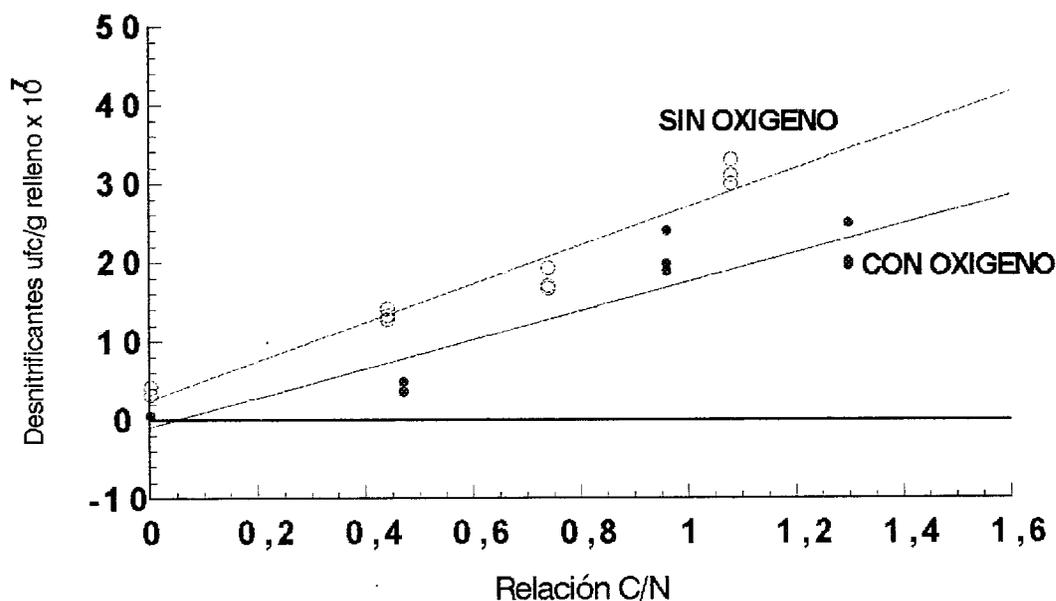
**Tabla 27.- Ajustes lineales obtenidos entre los recuentos de desnitrificantes (ufc/g relleno) y la relación C/N, para los ensayos con etanol.**

<b>Ajuste lineal sin oxígeno <math>y = a + bx</math></b>				
Variable dependiente: Desnitrificantes.				
Variable independiente: Relación C/N				
<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>T-estadística</b>	<b>P-valor</b>
<b>Ord. Origen</b>	2.61153e <sup>7</sup>	1.2016e <sup>7</sup>	2.17324	<0.05
<b>Pendiente</b>	2.4566e <sup>8</sup>	1.7400e <sup>7</sup>	14.118	< 0.001
<b>Coefficiente de correlación:</b> 0.975821		<b>r<sup>2</sup>:</b> 95.2226 %		
<b>Error estándar de la estimación:</b> 2.39356e <sup>7</sup>				
<b>Ajuste lineal con oxígeno <math>y = a + bx</math></b>				
Variable dependiente: Desnitrificantes				
Variable independiente: Relación C/N				
<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>T-estadística</b>	<b>P-valor</b>
<b>Ord. Origen</b>	-9.248e <sup>6</sup>	1.8424e <sup>7</sup>	-0.501964	< 0.05
<b>Pendiente</b>	1.8534e <sup>8</sup>	2.1895e <sup>7</sup>	8.46509	< 0.001
<b>Coefficiente de correlación:</b> 0.93677		<b>r<sup>2</sup>:</b> 87.7538 %		
<b>Error estándar de la estimación:</b> 3.73362e <sup>7</sup>				

Los valores de pendiente de la recta que se obtenían en los ensayos con etanol fueron muy semejantes a los del metanol, observándose para cada fuente de carbono un incremento muy

parecido. Los valores obtenidos para los alcoholes diferían, sin embargo, de los obtenidos para la sacarosa, los cuales fueron muy inferiores.

Para el proceso sin oxígeno había un incremento en los recuentos que iba desde  $0.36 \pm 0.057 \cdot 10^8$  ufc/g relleno, en la fase de formación de la biopelícula hasta  $3.13 \pm 0.15 \cdot 10^8$  ufc/g relleno para una relación C/N de 1.08 (figura 43), lo que suponía un incremento de casi 9 veces el valor inicial, semejante al experimentado para las otras fuentes de carbono.



**Figura 43. Recuentos de desnitificantes (ufc/g relleno) en función de la relación C/N del agua a tratar. Ensayos realizados con y sin O.D. y empleando etanol.**

Para el proceso con oxígeno el incremento fue mayor, aunque los valores fueron inferiores, pasando desde  $0.045 \pm 0.004 \cdot 10^8$  ufc/g relleno para C/N nulo, hasta  $2.16 \pm 0.29 \cdot 10^8$  ufc/g relleno, para la relación C/N 1.3.

Los valores obtenidos para los diferentes recuentos de bacterias desnitificantes, en los puntos donde se obtenía un rendimiento del 100%, fueron muy semejantes para las tres fuentes

de carbono ensayadas, tanto en presencia como en ausencia de fuente de carbono.

### 3.3.4.- Reductores de nitrato.

Los recuentos de reductores de nitrato manifestaban una tendencia ascendente conforme se incrementaba la dosificación de fuente de carbono. Los valores obtenidos para cada relación C/N presentaban diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.001$ ), tanto en los ensayos con oxígeno como los realizados sin el.

**Tabla 28.- Ajustes lineales obtenidos entre los recuentos de reductores de nitrato (ufc/g relleno) y la relación C/N, para los ensayos con etanol.**

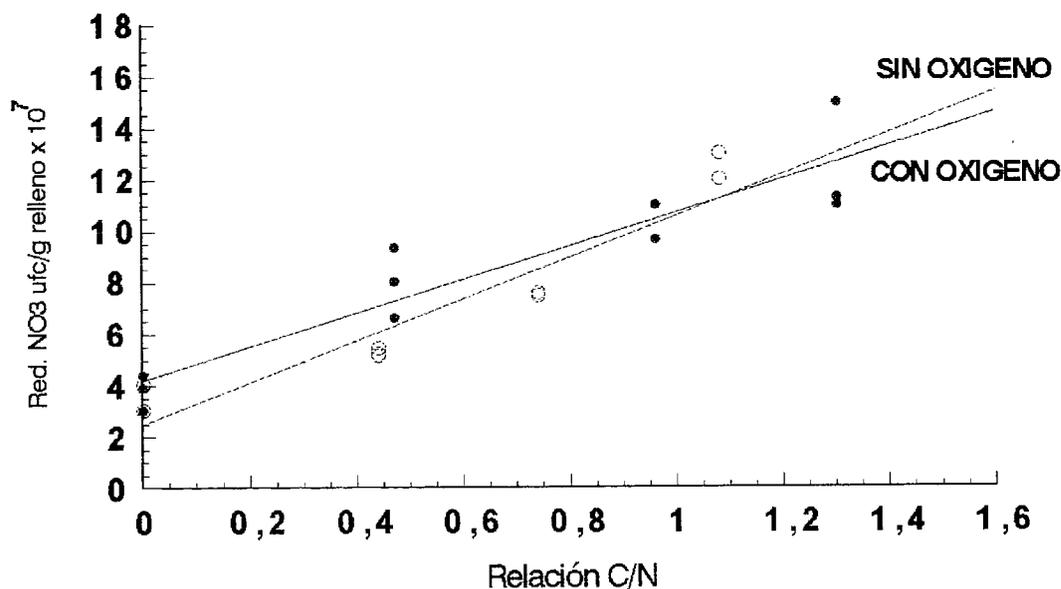
<b>Ajuste lineal sin oxígeno <math>y = a + bx</math></b>				
Variable dependiente: Reductores de nitrato.				
Variable independiente: Relación C/N				
<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>T-estadística</b>	<b>P-valor</b>
<b>Ord. Origen</b>	2.5089e <sup>7</sup>	5.4823e <sup>6</sup>	4.57639	<0.05
<b>Pendiente</b>	8.1331e <sup>7</sup>	7.9387e <sup>6</sup>	10.2449	< 0.001
<b>Coefficiente de correlación:</b> 0.955516		<b>r<sup>2</sup>:</b> 91.3011 %		
<b>Error estándar de la estimación:</b> 1.092e <sup>7</sup>				
<b>Ajuste lineal con oxígeno <math>y = a + bx</math></b>				
Variable dependiente: Reductores de nitrato				
Variable independiente: Relación C/N				
<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>T-estadística</b>	<b>P-valor</b>
<b>Ord. Origen</b>	4.2096e <sup>7</sup>	6.6535e <sup>6</sup>	6.32688	< 0.05
<b>Pendiente</b>	6.5499e <sup>7</sup>	7.9067e <sup>6</sup>	8.284	< 0.001
<b>Coefficiente de correlación:</b> 0.934245		<b>r<sup>2</sup>:</b> 87.2813 %		
<b>Error estándar de la estimación:</b> 1.34829e <sup>7</sup>				

En la tabla 28 se representan los ajustes lineales, obtenidos para cada ensayo, observando

como ambos procesos se ajustaban a una regresión lineal.

La pendiente obtenida para el proceso sin oxígeno, al igual que sucedió para los recuentos realizados a las otras dos comunidades bacterianas, fue mayor que la del proceso en ausencia de oxígeno. Ambas pendientes fueron superiores a las obtenidas para los ensayos realizados con metanol y sacarosa.

Los datos de los recuentos de reductores de nitrato y sus ajustes lineales se representan en la figura 44. Estos valores pasaban desde  $0.33 \pm 0.057 \cdot 10^8$  ufc/g relleno en la fase de formación de la biopelícula, hasta un valor de  $1.23 \pm 0.057 \cdot 10^8$  ufc/g relleno para una relación C/N 1.08, en el ensayo realizado sin oxígeno. El valor máximo fue superior al obtenido para el metanol y semejante al de la sacarosa en el punto donde se obtenía un 100% de rendimiento.



**Figura 44. Recuentos de reductores de nitrato (ufc/g relleno) en función de la relación C/N. Ensayos realizados con y sin O.D. y empleando etanol.**

Para el ensayo con oxígeno el incremento fue semejante, pasando de un valor de  $0.37 \pm 0.069 \cdot 10^8$  ufc/g relleno, hasta  $1.24 \pm 0.22 \cdot 10^8$  ufc/g relleno para una relación C/N de 1.3, un valor tres veces superior.

### 3,3,5.- Matriz de correlación

Las tablas 29 y 30 muestran las matrices de correlación obtenidas para los parámetros determinados en los estudios con etanol.

**Tabla 29. Coeficientes de correlación obtenidos para el ensayo con etanol sin O.D. C/N: Relación C/N; REND: Rendimiento en eliminación de N; NO<sub>3</sub>Sal: Nitrato en la salida; NO<sub>2</sub>Sal: Nitrito en la salida; Csal: Carbono en la salida; Bio: Biopelícula; HAO: Heterótrofos capaces de crecer sin oxígeno; Des: Desnitrificantes; Red: Reductores de nitrato.**

	C/N	REND	NO <sub>3</sub> Sal	NO <sub>2</sub> Sal	Csal	Bio	HAO	Des	Red
C/N	1.00								
REND	0.981	1.00							
NO <sub>3</sub> Sal	-0.984	-0.999	1.00						
NO <sub>2</sub> Sal	-0.299	-0.410	0.373	1.00					
Csal	0.746	0.847	0.829	-0.754	1.00				
Bio	0.983	0.946	-0.955	-0.148	0.635	1.00			
HAO	0.960	0.974	-0.981	-0.246	0.773	0.943	1.00		
Des	0.976	0.989	-0.984	-0.463	0.847	0.930	0.944	1.00	
Red	0.955	0.987	-0.984	-0.463	0.885	0.906	0.958	0.974	1.00

Nuevamente la relación C/N se correlacionaba con los recuentos realizados para las comunidades bacterianas ensayadas, el tamaño de la biopelícula y el rendimiento, tanto en los ensayos con oxígeno como sin el. También se apreciaba correlación, aunque negativa, con las concentraciones de nitrato en la salida, no sucediendo lo mismo con las concentraciones de nitrito. Los valores de carbono en la salida también presentaban cierta correlación con la relación C/N, aunque no tan significativa.

**Tabla 30. Coeficientes de correlación obtenidos para el ensayo con etanol y con O.D.C/N: Relación C/N; REND: Rendimiento en eliminación de N; NO<sub>3</sub>Sal: Nitrato en la salida; NO<sub>2</sub>Sal: Nitrito en la salida; Csal: Carbono en la salida; Bio: Biopelícula; HAO: Heterótrofos capaces de crecer sin oxígeno; Des: Desnitrificantes; Red: Reductores de nitrato.**

	C/N	REND	NO <sub>3</sub> Sal	NO <sub>2</sub> Sal	Csal	Bio	HAO	Des	Red
C/N	1.00								
REND	0.994	1.00							
NO <sub>3</sub> Sal	-0.983	-0.996	1.00						
NO <sub>2</sub> Sal	0.283	0.347	-0.375	1.00					
Csal	0.751	0.721	-0.716	-0.360	1.00				
Bio	0.956	0.965	-0.936	0.152	0.811	1.00			
HAO	0.966	0.967	-0.952	0.407	0.609	0.920	1.00		
Des	0.935	0.956	-0.969	0.501	0.608	0.865	0.916	1.00	
Red	0.933	0.918	-0.898	0.296	0.644	0.901	0.893	0.826	1.00

Al igual que para las otras fuentes de carbono, no se apreciaba correlación entre los valores de nitrito en el agua de salida y el resto de parámetros ensayados.

Los recuentos obtenidos para las tres comunidades bacterianas estudiadas se correlacionaban entre si, siendo menos significativos los coeficientes obtenidos para los reductores de nitrato respecto a los desnitrificantes y HAO en los ensayos realizados con oxígeno. Igual grado de correlación se manifestaba entre los valores del tamaño de la biopelícula y los recuentos

Los valores de rendimiento, al igual que para los ensayos realizados con otras fuentes de carbono, estaban altamente correlacionados con las comunidades bacterianas ensayadas y la biopelícula. Igualmente las concentraciones de nitrato en el agua de salida se correlacionaban aunque con signo negativo con las comunidades bacterianas.

#### **4.- IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS CEPAS DESNITRIFICANTES AISLADAS.**

Cada una de las diferentes morfologías coloniales aisladas e identificadas como desnitrificantes, se contó por separado, independientemente de los valores totales de desnitrificantes obtenidos en los recuentos. Posteriormente se identificaron taxonómicamente, conociendo de este modo la evolución de cada una de las especies bacterianas desnitrificantes, presentes en la biopelícula, en función del incremento en la concentración de fuente de carbono.

El estudio se realizó para cada una de las tres fuentes de carbono ensayadas y en presencia (4.5 mg/l) y ausencia de oxígeno disuelto en el agua a tratar.

En los seis ensayos realizados se observó como el incremento de fuente de carbono, no solo aumentaba el número total de bacterias desnitrificantes presentes en la biopelícula, sino que aumentaba también la diversidad de especies. Las diferentes especies identificadas incrementaban, por lo general, su cantidad en la biopelícula o la descendían conforme se aumentaba la dosificación de fuente de carbono.

4.1.- SACAROSA

Las identificaciones realizadas sobre las cepas aisladas en los ensayos con sacarosa y ausencia de oxígeno (realizado en primavera de 1995), mostraban como especie desnitrificante predominante a *Pseudomonas fluorescens*. Esta especie aumentaba su presencia en la biopelícula, variando desde  $2.16 \pm 0.28 \cdot 10^7$  ufc/g relleno para una relación C/N de 0.12, hasta valores de  $18.9 \pm 0.46 \cdot 10^7$  ufc/g relleno, para una relación C/N de 2.5 (figura 45). Para la mayoría de los recuentos realizados, esta especie se encontraba en un porcentaje algo superior al 50% del total de los desnitrificantes presentes en la biopelícula.

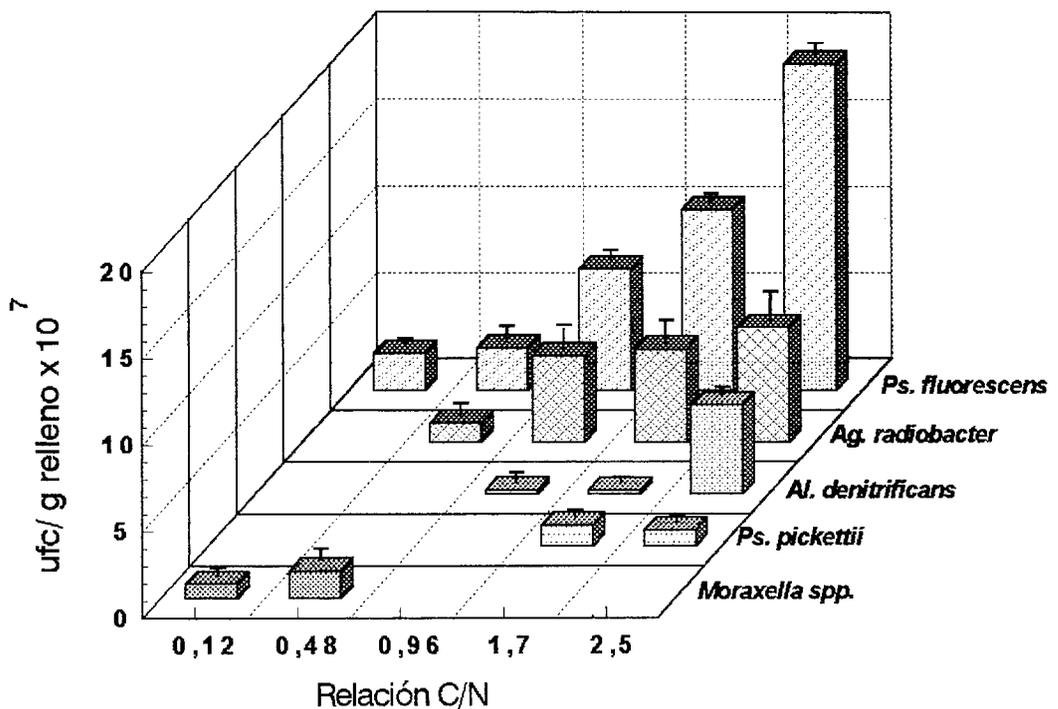


Figura 45. Número de bacterias desnitrificantes en función de la relación C/N, obtenidos en los ensayos con sacarosa y sin O.D. Recuentos para cada especie identificada.

Otra de las especies mayoritarias en los ensayos sin oxígeno fue Agrobacterium radiobacter, la cual no se identificó hasta los recuentos realizados para la relación C/N 0.48, en los que alcanzaba un valor de  $1.126 \pm 0.6 \cdot 10^7$ , lo que suponía un 21.6% del total de los desnitrificantes para esa relación C/N. Conforme se incrementaba la dosificación de fuente de carbono, crecía el número de bacterias, llegando a un valor de  $6.67 \pm 1.1 \cdot 10^7$  ufc/g relleno para la relación C/N 2.5.

Otras especies identificadas en los ensayos sin oxígeno fueron Moraxella spp, que desaparecía para una relación C/N 0.48, Pseudomonas pickettii que aparecía en los recuentos realizados para la relación C/N 1.7 o Alcaligenes denitrificans, aislado en los recuentos realizados para la relación C/N 0.96 y que llegaba a alcanzar un recuento de  $5.16 \pm 0.76 \cdot 10^7$  ufc/g relleno, lo cual suponía el 16.3% de los desnitrificantes presentes en la biopelícula para la relación C/N 2.5.

En los ensayos con oxígeno disuelto en el agua a tratar (realizado en verano de 1996), a excepción de Al. denitrificans, aislado para la relación C/N 0.5, y Ag. radiobacter, las cepas presentes en la biopelícula eran diferentes a las obtenidas en el proceso sin oxígeno.

Para estos ensayos con oxígeno, la especie dominante fue Kingella denitrificans, la cual se aislaba a partir de la relación C/N 1.0 con un recuento de  $5.0 \pm 0.5 \cdot 10^7$  ufc/g relleno (48.45% del total de los desnitrificantes aislados) y que para la relación C/N 2.85 alcanzaba un recuento de  $11.16 \pm 0.21 \cdot 10^7$  ufc/g relleno, lo cual suponía un 56% del total de los desnitrificantes presentes en la biopelícula (figura 46).

Fue también significativa la presencia de cepas de Ag. radiobacter, que pasaban de un recuento de  $0.36 \pm 0.048 \cdot 10^7$  ufc/g relleno, en la fase de formación de la biopelícula, hasta valores de  $5.53 \pm 0.51 \cdot 10^7$  ufc/g relleno para la relación C/N 2.85, lo cual suponía un total del 27.8% del total de los desnitrificantes presentes en la biopelícula, valor semejante al obtenido en la fase sin oxígeno.

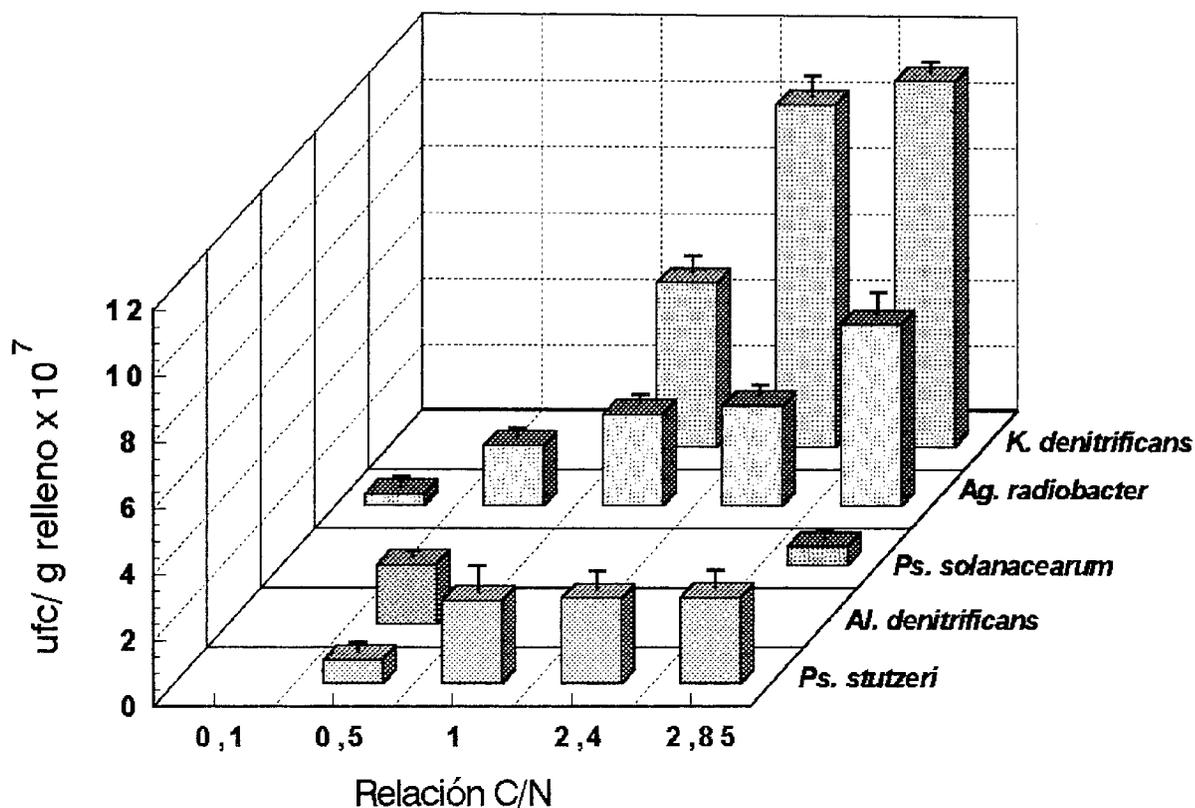


Figura 46. Número de bacterias desnitrificantes en función de la relación C/N, obtenidos en los ensayos con sacarosa y sin O.D. Recuentos para cada especie identificada.

Otra especie para la que se obtenían recuentos significativos fue *Pseudomonas stutzeri*, la cual se aisló para la relación C/N 0.5 con un recuento de  $1.26 \pm 0.46 \cdot 10^7$  ufc/g relleno, llegando a alcanzar en la relación C/N 2.85 un valor de  $2.63 \pm 0.55 \cdot 10^7$  ufc/g relleno, lo cual suponía un total del 13.23% de los desnitrificantes aislados.

También se aislaron cepas de la especie *Pseudomonas solanacearum* para la relación C/N 2.85, alcanzando solo un 2.89% del total de los desnitrificantes presentes en la biopelícula.

4.2.- METANOL

Al igual que lo sucedido para los ensayos realizados con sacarosa, tanto los recuentos de cepas desnitrificantes como la diversidad de especies, aumentaban conforme se incrementaba la relación C/N. Hay que destacar que las especies dominantes que se obtenían en el ensayo con oxígeno fueron diferentes a las aisladas para el ensayo sin el. La formación de la biopelícula fue en diferente época del año, a pesar de ello en estos ensayos se encontró cierta homología entre las especies presentes en la biopelícula, para los dos ensayos.

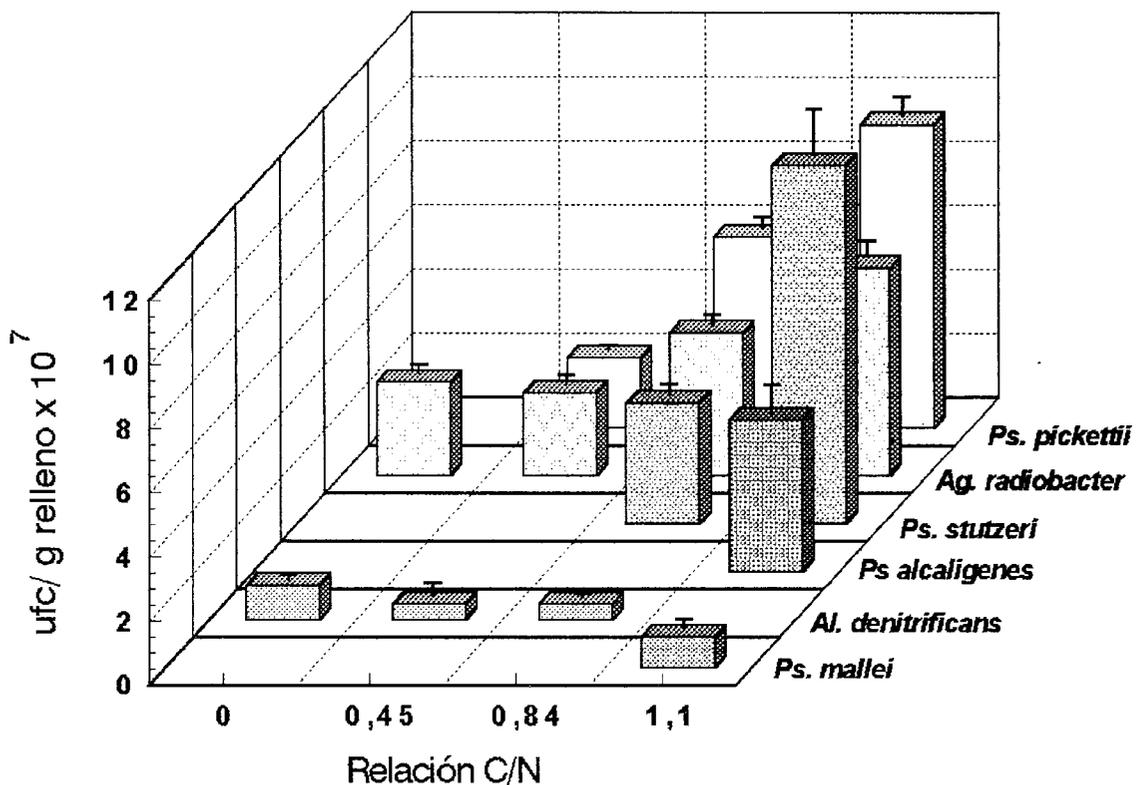


Figura 47. Número de bacterias desnitrificantes en función de la relación C/N, obtenidos en los ensayos con metanol y sin O.D. Recuentos para cada especie identificada.

En los estudios realizados sin oxígeno (figura 47), la especie mayoritaria variaba conforme se incrementaba la relación C/N. Ag. radiobacter destacaba como mayoritario para la fase de formación de la biopelícula y para la relación C/N 0.45, alcanzando en este punto un valor cercano al 50%. Este porcentaje descendía para mayores dosificaciones de fuente de carbono, aunque los recuentos se incrementaban, pasando de un valor de  $2.92 \pm 0.17 \cdot 10^7$  ufc/g relleno en la fase de formación de la biopelícula, hasta  $6.5 \pm 0.48 \cdot 10^7$  ufc/g relleno para la relación C/N 1.1, en la que se lograba el 100% de eliminación del nitrógeno presente en el agua a tratar.

Ps. stutzeri, que se aislaba para los recuento realizados en la relación C/N 0.84, alcanzaba un recuento de  $11.17 \pm 1.5 \cdot 10^7$  ufc/g relleno para la relación C/N 1.1, por lo que destacaba como especie dominante con un 34% del total de los desnitrificantes presentes en la biopelícula.

Junto con las dos especies descritas anteriormente, destacaba también Ps. pickettii, aislada para la relación C/N 0.45 con un recuento de  $2.19 \pm 0.15 \cdot 10^7$  ufc/g relleno, la cual alcanzaba un valor de  $9.47 \pm 0.58 \cdot 10^7$  ufc/g relleno para la relación C/N 1.1, lo cual suponía un 28.8% del total de los desnitrificantes.

Otras especies aisladas fueron Al. denitrificans que no se llegó a identificar para la relación C/N 1.1, así como Pseudomonas mallei y Pseudomonas denitrificans. Esta última especie llegó a alcanzar el 14.5% del total de los desnitrificantes presentes en la biopelícula para la relación C/N 1.1.

Para los ensayos con oxígeno (figura 48), la bacteria desnitrificante predominante fue Ag. radiobacter. Esta especie se aisló en la fase de formación de la biopelícula, alcanzando un valor de  $1.49 \pm 0.034 \cdot 10^7$  ufc/g relleno, creciendo posteriormente hasta valores de  $9.37 \pm 0.24 \cdot 10^7$  ufc /g relleno, para una relación C/N de 1.27. Este valor suponía un 38.2% del total de los desnitrificantes aislados en esta fase.

Junto con Ag. radiobacter, se aisló, también en gran porcentaje, la especie Ps. fluorescens,

que se obtenía anteriormente para los ensayos con sacarosa sin oxígeno. Esta especie apareció en la fase de formación de la biopelícula con un valor de  $2.15 \pm 0.205 \cdot 10^7$  ufc/g relleno, creciendo conforme se incrementaba la dosificación de fuente de carbono hasta valores de  $7.09 \pm 0.21 \cdot 10^7$  ufc/g relleno. Este recuento suponía un porcentaje del 28.9%.

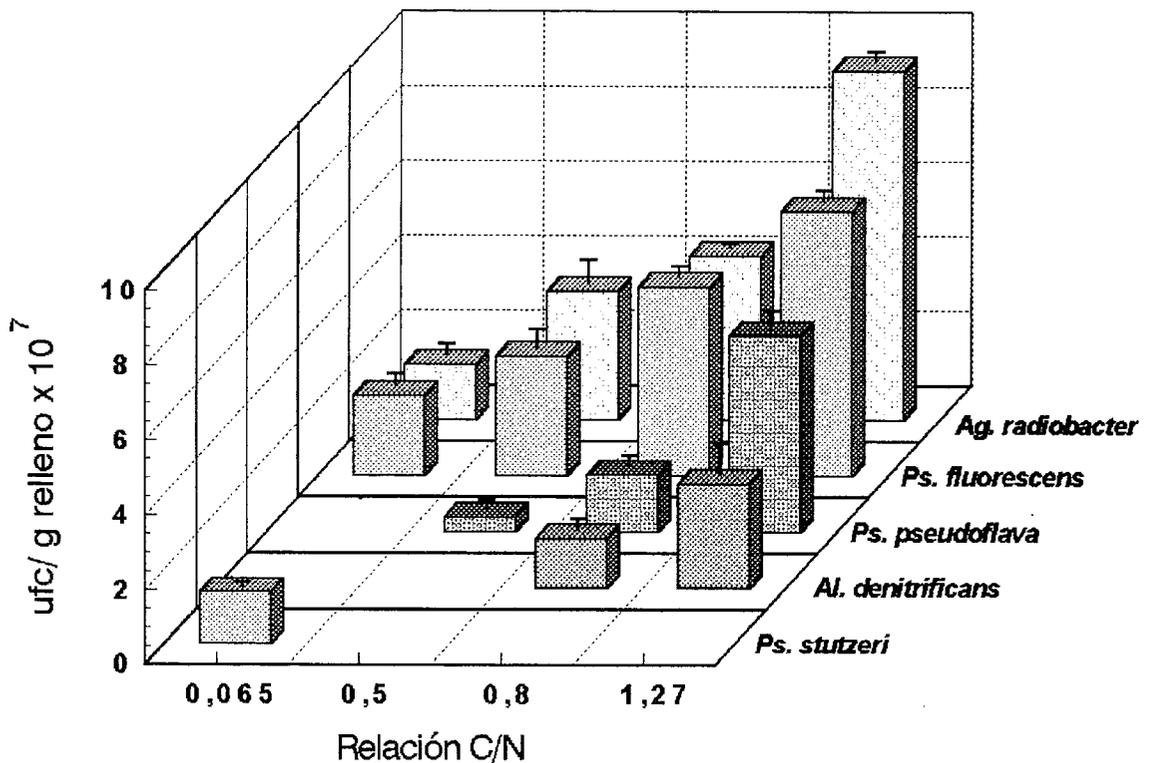


Figura 48. Número de bacterias desnitrificantes en función de la relación C/N, obtenidos en los ensayos con metanol y con O.D. Recuentos para cada especie identificada.

Otra especie significativa fue *Pseudomonas pseudoflava*, que solo se aisló en estos ensayos. La especie se obtenía para una relación C/N de 0.5 donde contaba con un recuento de  $0.403 \pm 0.1 \cdot 10^7$  ufc/g relleno. Esta bacteria manifestó un crecimiento conforme aumentaba la dosificación de fuente de carbono, alcanzando para la relación C/N de 1.27 un valor de  $5.27 \pm 0.45 \cdot 10^7$  ufc/g relleno, un 21.47% del total de los desnitrificantes.

Otras especies aisladas fueron *Ps. stutzeri*, que solo se aisló en la fase de formación de la biopelícula y *Al. denitrificans*. Esta especie se obtuvo inicialmente para una relación C/N de 0.8, alcanzando para la relación C/N 1.27 un porcentaje del 11.4% de los desnitrificantes aislados en este punto en el que se obtenía la eliminación total del nitrógeno presente en el agua de salida.

#### 4,4,3.- ETANOL

Los aislamientos con etanol siguieron igual tónica que el resto de ensayos, en cuanto al crecimiento de los recuentos y diversidad de cepas desnitrificantes con respecto al incremento de la dosificación de fuente de carbono.

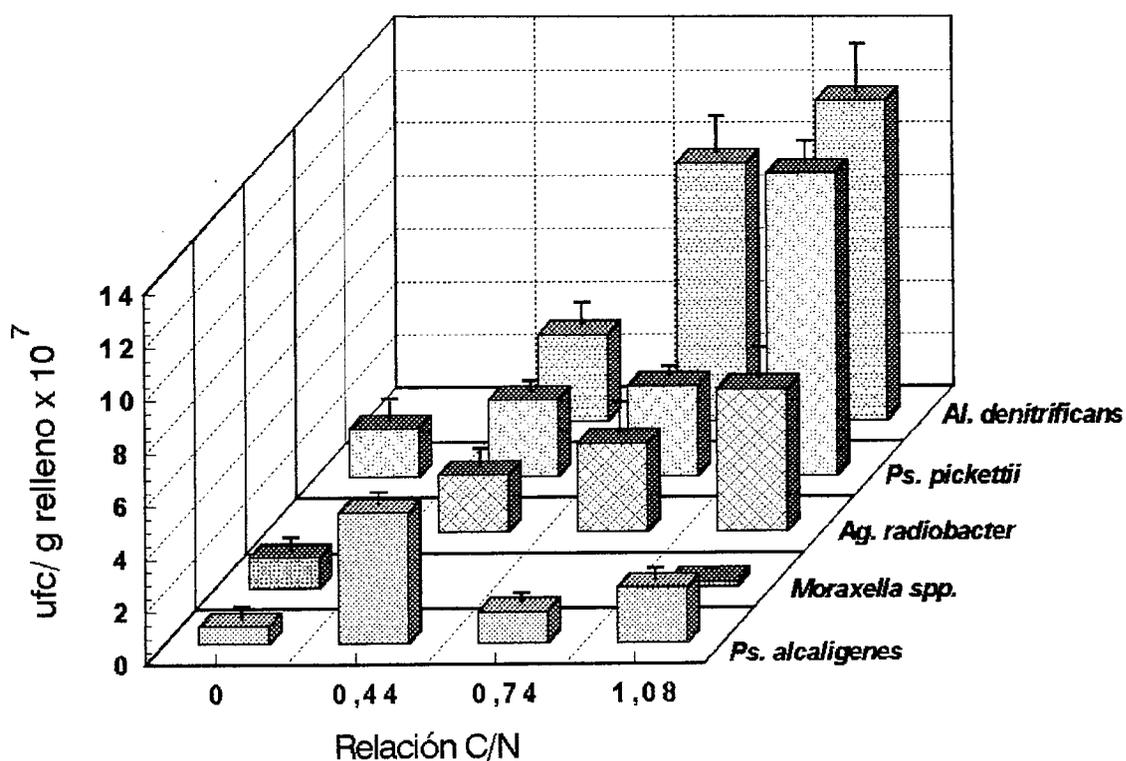


Figura 49. Número de bacterias desnitrificantes en función de la relación C/N, obtenidos en los ensayos con etanol y sin O.D. Recuentos para cada especie identificada.

Las especies dominantes en los ensayos sin oxígeno (figura 49), realizada en mayo de 1996, ya habían sido aisladas con anterioridad en los estudios con metanol y sacarosa. Estas especies eran Al. denitrificans y Ag. radiobacter. Ambas cepas se aislaron para una relación C/N de 0.44, no encontrándose en la fase inicial de formación de la biopelícula.

Al. denitrificans fue la especie mayoritaria en la fase de mayor eliminación de nitrógeno. Esta experimentó un crecimiento desde un valor de  $3.28 \pm 0.45 \cdot 10^7$  ufc/g relleno para la relación C/N 0.44, hasta  $12.12 \pm 1.79 \cdot 10^7$  ufc/g relleno, para la relación 1.08, suponiendo el 38.69% del total de los desnitrificantes aislados.

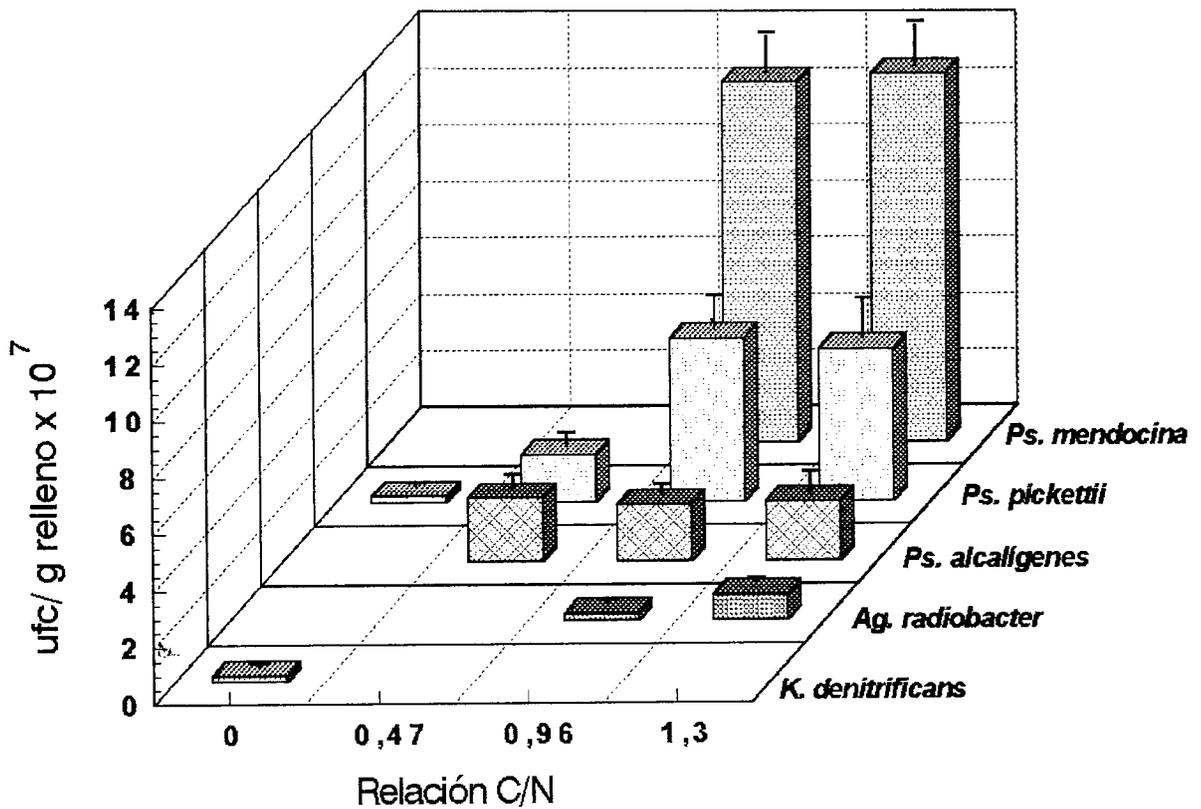
El crecimiento de Ag. radiobacter no fue tan pronunciado como para las especies anteriores, pasando de un valor de  $2.17 \pm 0.33 \cdot 10^7$  ufc/g relleno para la relación C/N 0.44, hasta  $5.42 \pm 0.62 \cdot 10^7$  ufc/g relleno, para la relación C/N de 1.08, suponiendo para esta relación el 17.3% del total de los desnitrificantes presentes en la biopelícula.

Otra de las especies destacadas en el ensayo sin oxígeno fue Ps. pickettii, ya aislada anteriormente en los ensayos con metanol y sacarosa. Esta especie se aisló en la fase de formación de la biopelícula, creciendo desde un valor de  $1.83 \pm 0.57 \cdot 10^7$  ufc/g relleno hasta  $11.46 \pm 0.48 \cdot 10^7$  ufc/g relleno, para la relación C/N 1.08, lo cual suponía un 36.59% del total de los desnitrificantes aislados.

La especie Pseudomonas alcaligenes, se aisló para todas las relaciones C/N ensayadas, manifestando un incremento en los recuentos, desde  $0.66 \pm 0.2 \cdot 10^7$  ufc/g relleno, hasta  $2.1 \pm 0.36 \cdot 10^7$  ufc/g relleno, para la relación C/N 1.08, alcanzando el 6.7% del total de los desnitrificantes aislados.

Moraxella spp. se aisló también en estos ensayos aunque sus valores eran muy inferiores, con respecto a los presentados por el resto de especies.

La figura 50 muestra las especies aisladas en los ensayos con etanol en presencia de oxígeno disuelto. En ella se observa como las especies aisladas en estos estudios, realizados en el verano de 1996, eran semejantes a los obtenidos en los ensayos sin oxígeno.



**Figura 50. Número de bacterias desnitrificantes en función de la relación C/N, obtenidos en los ensayos con etanol y con O.D. Recuentos para cada especie identificada.**

Nuevamente destacó *Ps. pickettii*, que aparecía en la fase de formación de la biopelícula con un valor de  $0.24 \pm 0.04 \cdot 10^7$  ufc/g relleno, creciendo hasta valores de  $5.42 \pm 1.22 \cdot 10^7$  ufc/g relleno, para la relación C/N 1,3, en la que se eliminaba por completo el nitrógeno presente en el agua a tratar. Estos valores suponían un 25.13% del total de las cepas desnitrificantes aisladas.

Para este ensayo Pseudomonas mendocina fue la especie predominante, la cual se aislaba para la relación C/N 0.96 y en para la fase de mayor rendimiento, en la que alcanzaba un valor de  $13.1 \pm 2.1 \cdot 10^7$  ufc/g relleno. Esta especie que solo fue aislada en estos ensayos, representaba el 60% del total de las bacterias desnitrificantes presentes en la biopelícula.

Tanto Ps. alcaligenes como Ag. radiobacter destacaron también en estos ensayos, aunque sus recuentos fueron inferiores a los obtenidos en la fase sin oxígeno. Ambas especies se aislaban para la relación C/N 1.3 alcanzando un porcentaje del 9.89% y 4.25% respectivamente, del total de desnitrificantes presentes en la biopelícula.

Tan solo para la fase de formación de la biopelícula se aisló la especie K. denitrificans, desapareciendo posteriormente, para mayores relaciones C/N.

## **5.- ACTIVIDAD DESNITRIFICANTE DE LAS CEPAS BACTERIANAS AISLADAS.**

La actividad desnitrificante de las diferentes cepas estudiadas se expresó en nmoles  $N_2O/ufc \cdot h$ , lo cual precisaba para cada cepa la determinación de su capacidad para producir  $N_2O$  desde  $NO_3^-$ , en un medio donde este y la fuente de carbono no fuesen limitantes. Debido al crecimiento bacteriano en el medio de cultivo que se empleó, se precisaba también la determinación del número total de bacterias que producían la concentración final de  $N_2O$ . Las medidas se realizaron para diferentes tiempos (6, 12, 24, 48 y 72 horas tras la inoculación), considerando su valor medio como la actividad desnitrificante de cada cepa.

Los valores de actividad desnitrificante obtenidos para cada una de las cepas aisladas, presentaban diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $P < 0.01$ ), observándose diferentes comportamientos para cada cepa, las cuales se agrupaban coincidiendo la mayor o menor actividad desnitrificante con el tipo de especie taxonómica.

**Tabla 31.- Actividad desnitrificante de las diferentes cepas aisladas (ss: sacarosa sin O.D.; sc: sacarosa con O.D.; ms: metanol sin O.D.; mc: metanol con O.D.; es: etanol sin O.D.; ec: etanol con O.D.).**

<b>ENSAYO</b>	<b>C/N</b>	<b>ESPECIE BACTERIANA</b>	<b>ACTIVIDAD (nmol N<sub>2</sub>O/ 10<sup>9</sup> ufc · h)</b>
es	0	Moraxella	1.36
ec	0.47	Pseudomonas alcaligenes	3.71
mc	0.5	Pseudomonas pseudoflava	6.85
ms	1.1	Pseudomonas mallei	10.4
mc	0.8	Alcaligenes denitrificans	13.8
ms	0	Alcaligenes denitrificans	16.7
ms	0.45	Alcaligenes denitrificans	18.5
ms	0.84	Alcaligenes denitrificans	19.7
es	0	Pseudomonas pickettii	22.4
es	0.44	Pseudomonas alcaligenes	23.0
sc	2.4	Pseudomonas stutzeri	25.8
es	0	Pseudomonas alcaligenes	28.2
mc	1.27	Alcaligenes denitrificans	31.4
sc	2.40	Kingella denitrificans	35.7
ss	0.96	Alcaligenes denitrificans	40.8
ss	0.12	Pseudomonas fluorescens	41.7
ec	0	Pseudomonas pickettii	43.4
ec	0.47	Pseudomonas pickettii	45.7
sc	0.5	Pseudomonas stutzeri	48.8
sc	2.85	Kingella denitrificans	50.4
es	0.44	Pseudomonas pickettii	50.9
ms	0	Agrobacterium radiobacter	52.0
ms	0.84	Pseudomonas stutzeri	52.3
sc	1	Kingella denitrificans	53.2
sc	2.85	Pseudomonas stutzeri	53.4
ss	1.7	Alcaligenes denitrificans	54.7
mc	0.8	Pseudomonas pseudoflava	62.5
ss	0.96	Pseudomonas fluorescens	64.9
ss	0.48	Pseudomonas fluorescens	69.3
ss	2.5	Alcaligenes denitrificans	69.5
ec	0.96	Pseudomonas alcaligenes	76.7
mc	1.27	Pseudomonas pseudoflava	77.1
sc	0.5	Alcaligenes denitrificans	81.6
ms	0.84	Pseudomonas pickettii	81.7
ss	0.48	Moraxella	84.3
ss	0.12	Moraxella	89.5
ss	1.7	Pseudomonas pickettii	92.8
ms	1.1	Pseudomonas stutzeri	102.0
es	1.08	Moraxella	105.0
es	1.08	Pseudomonas pickettii	118.0
es	0.74	Pseudomonas pickettii	133.0
sc	2.85	Pseudomonas solanacearum	138.0
ec	0.96	Pseudomonas mendocina	144.0
ms	1.1	Pseudomonas pickettii	153.0
ec	0.96	Pseudomonas pickettii	214.0
es	0.74	Agrobacterium radiobacter	218.0
ss	2.5	Pseudomonas pickettii	222.0
sc	1	Pseudomonas stutzeri	238.0

**RESULTADOS**

<b>ENSAYO</b>	<b>C/N</b>	<b>ESPECIE BACTERIANA</b>	<b>ACTIVIDAD (nmol N<sub>2</sub>O/ 10<sup>9</sup> ufc · h)</b>
ms	1.1	Pseudomonas alcaligenes	249.0
ec	1.3	Pseudomonas pickettii	259.0
sc	0.1	Agrobacterium radiobacter	266.0
es	0.44	Agrobacterium radiobacter	274.0
ss	1.7	Pseudomonas fluorescens	277.0
es	0.74	Alcaligenes denitrificans	283.0
sc	1	Agrobacterium radiobacter	292.0
mc	0.065	Pseudomonas stutzeri	296.0
ec	0	Kingella denitrificans	302.0
es	0.44	Alcaligenes denitrificans	309.0
mc	0.065	Agrobacterium radiobacter	315.0
sc	0.5	Agrobacterium radiobacter	313.0
sc	2.4	Agrobacterium radiobacter	317.0
es	1.08	Pseudomonas alcaligenes	349.0
mc	1.27	Agrobacterium radiobacter	359.0
ss	2.5	Agrobacterium radiobacter	363.0
mc	0.5	Agrobacterium radiobacter	367.0
es	0.74	Pseudomonas alcaligenes	375.0
sc	2.85	Agrobacterium radiobacter	379.0
es	1.08	Agrobacterium radiobacter	420.0
mc	0.065	Pseudomonas fluorescens	429.0
es	1.08	Alcaligenes denitrificans	468.0
ss	1.7	Agrobacterium radiobacter	480.0
ms	0.45	Agrobacterium radiobacter	496.0
mc	0.5	Pseudomonas fluorescens	511.0
ms	0.45	Pseudomonas pickettii	545.0
ss	2.5	Pseudomonas fluorescens	561.0
ec	0.96	Agrobacterium radiobacter	575.0
mc	0.8	Agrobacterium radiobacter	577.0
ec	1.3	Agrobacterium radiobacter	827.0
ec	1.3	Pseudomonas mendocina	828.0
mc	0.8	Pseudomonas fluorescens	841.0
ec	1.3	Pseudomonas alcaligenes	1030.0
ms	1.1	Agrobacterium radiobacter	1060.0
ss	0.96	Agrobacterium radiobacter	1190.0
mc	1.27	Pseudomonas fluorescens	1400.0
ss	0.48	Agrobacterium radiobacter	1540.0
ms	0.84	Agrobacterium radiobacter	1770.0

En la tabla 31 se ordenan las diferentes cepas aisladas, indicando el ensayo del que proceden, la relación C/N ensayada en su aislamiento, la especie a la que pertenece y su actividad desnitrificante expresada en nmoles N<sub>2</sub>O/ufc h. El orden viene marcado por su mayor o menor actividad desnitrificante.

La media de todas las actividades desnitrificantes fue de  $2.89 \cdot 10^{-7}$  nmoles  $N_2O$ / ufc·h, valor por debajo del cual se encontraban el 63% de total las cepas aisladas. Por otro lado y tras realizar un análisis de percentiles se observó que solo el 25% del total de las cepas aisladas superaban la actividad de  $3.67 \cdot 10^{-7}$  nmol  $N_2O$ / ufc h.

Utilizando los datos anteriormente indicados, se pretendió analizar si existía alguna relación entre la actividad desnitrificante de las cepas aisladas y la especie bacteriana con la que se habían identificado taxonómicamente.

De todas las especies identificadas, destacaron por su actividad desnitrificante las denominadas como Agrobacterium radiobacter y Pseudomonas fluorescens. Las primeras no solo destacaban por aislarse más frecuentemente (estaban presentes en todos los ensayos realizados), de todas las aisladas, independientemente de la fuente de carbono empleada, el 81.8% presentaban una actividad desnitrificante superior al valor medio y el 54.5% estaban por encima del valor  $3.67 \cdot 10^{-7}$ , correspondiente al 25% de las cepas totales más activas.

Ps. fluorescens, también destacó por su frecuencia de aislamientos, aunque no estaba presente en todos los ensayos. Del total de cepas identificadas en esta especie, el 55.5% presentaban una actividad superior a la media incluyéndose a su vez en el grupo del 25% más activo. Otras especies que destacaban por su alta actividad desnitrificante fueron Pseudomonas mendocina ó Pseudomonas alcaligenes.

Un comportamiento completamente contrario se observaba para las especies Pseudomonas pickettii, Pseudomonas stutzeri, Alcaligenes denitrificans, Moraxella, Pseudomonas pseudoflava o Kingella denitrificans. De todas ellas destacaban por su frecuencia de aislamientos Ps. pickettii, Ps. stutzeri y Al. denitrificans de las cuales, la mayoría de las cepas presentaban una actividad desnitrificante inferior a la media, siendo sus porcentajes de 92.3, 85.7 y 83.33% respectivamente.

Especies como Moraxella, Ps. pseudoflava, Pseudomonas mallei o Pseudomonas

solanacearum, presentaban para todas sus cepas actividades desnitrificantes inferiores a la media y se aislaban con menor frecuencia.

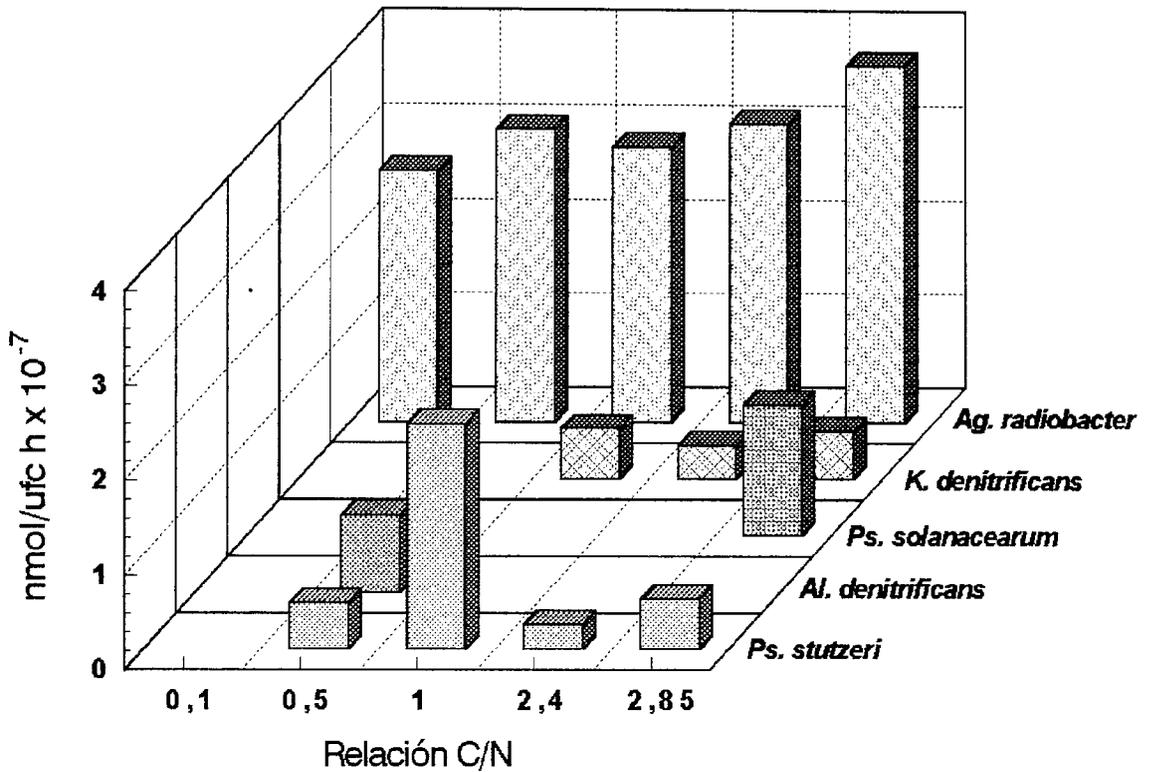
Atendiendo a la fuente de carbono, había que destacar la influencia que tenía el aumento en la dosificación de esta, la cual incrementaba, por lo general, la actividad desnitrificante de las diferentes especies. Por otro lado hay que destacar que también se observaban diferencias en la actividad desnitrificante, en función de la fuente de carbono empleada y la presencia o no de oxígeno en el proceso.

### **5,1.- SACAROSA**

Las cepas aisladas en los ensayos con sacarosa eran, por lo general, menos activas que las obtenidas de los ensayos con los alcoholes. El 71% de estas cepas presentaban una actividad inferior al valor medio de actividad desnitrificante y tan solo el 16% estaban en el grupo de las más activas. Hay que destacar que de los seis ensayos realizados, en el de sacarosa con oxígeno disuelto en el agua a tratar se aislaban las cepas menos activas. De todas ellas, solo el 6% presentaban una actividad alta, estando el 73.3% por debajo de la media.

La figura 51 muestra la actividad desnitrificante de las diferentes cepas que se aislaron en los ensayos con sacarosa y oxígeno disuelto en el agua a tratar, en función de la relación C/N. En ella se puede apreciar la mayor actividad desnitrificante presentada por las cepas de Ag. radiobacter, la cual presentaba una tendencia ascendente conforme se incrementaba la dosificación de la fuente de carbono. El resto de cepas aisladas no presentaban una actividad muy destacable.

Las cepas aisladas en los ensayos sin oxígeno disuelto, presentaban mayor actividad desnitrificante, encontrándose el 25% de ellas entre las cepas más activas. Hay que destacar en este ensayo el aislamiento de dos cepas de Ag. radiobacter que presentaron las mayores actividades de las registradas para todas las cepas (figura 52). Destacaron también en este ensayo las cepas de Ps. fluorescens aisladas, en las cuales se observa la influencia de la fuente de carbono en su mayor actividad.



**Figura 51.** Actividad desnitrificante (nmol/ufc·h) de las cepas aisladas en los ensayos con sacarosa y presencia de O.D., en función de la relación C/N.

Si la actividad desnitrificante obtenida para cada cepa (nmol/ufc· h) en medios de cultivo sin limitación de nutrientes, se multiplicaba por los recuentos obtenidos para cada especie identificada en cada relación C/N ensayada, se obtenían valores orientativos de la actividad desnitrificante potencial que nos permitían comparar el proceso con y sin oxígeno. Si se comparaban los valores obtenidos empleando sacarosa (figura 53), se observaba como la influencia del oxígeno hacía que la actividad potencial fuese inferior. Esta influencia fue mucho más acusada en los ensayos con sacarosa, incrementándose las diferencias conforme aumentaba la relación C/N, la cual aumentaba la actividad para los dos casos. Estas diferencias se debían a los menores recuentos y actividades presentadas por las cepas aisladas en los ensayos con oxígeno.

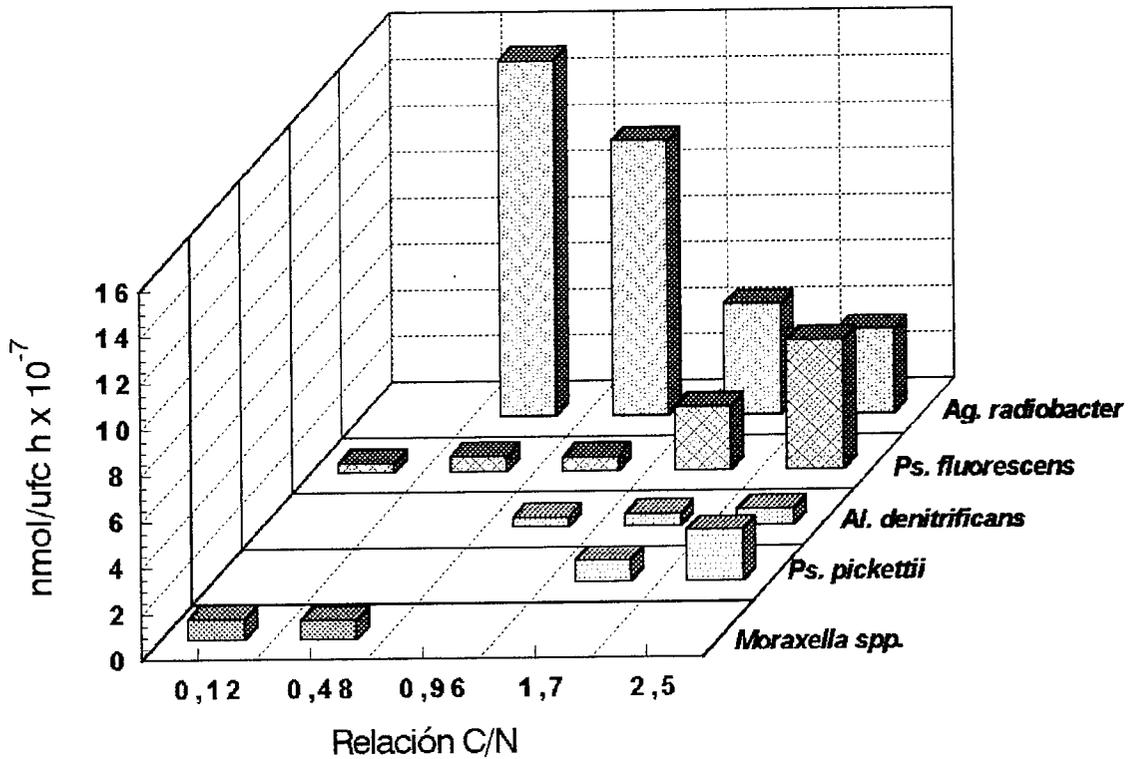


Figura 52. Actividad desnitrificante (nmol/ufc·h) de las cepas aisladas en los ensayos con sacarosa en ausencia de O.D., en función de la relación C/N.

### 5.2.- METANOL

Las cepas aisladas en los ensayos con metanol fueron las más activas. De todas ellas solo el 53.6% presentaban una actividad inferior a la media, siendo este porcentaje el menor de los obtenidos para las tres fuentes de carbono ensayadas. Por otro lado destacaba que el 32.1% de las cepas se encontraban dentro del grupo de las más activas.

Destacaba en este caso las cepas aisladas en el ensayo con oxígeno disuelto en el agua a tratar (figura 54), de las cuales solo el 35.7% tenían una actividad inferior a la media y el 43% se encontraban en el grupo de mayor actividad.

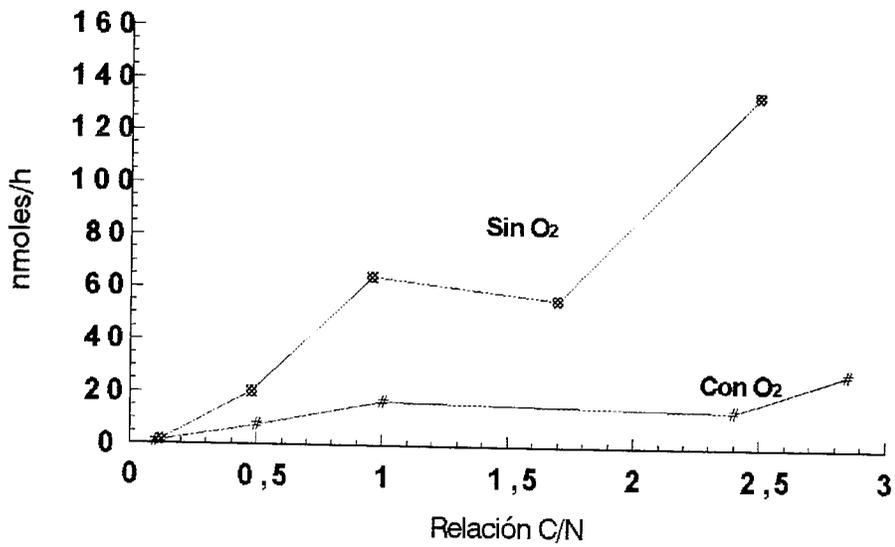


Figura 53. Comparación de las actividades desnitrificantes potenciales obtenidas para los ensayos con sacarosa.

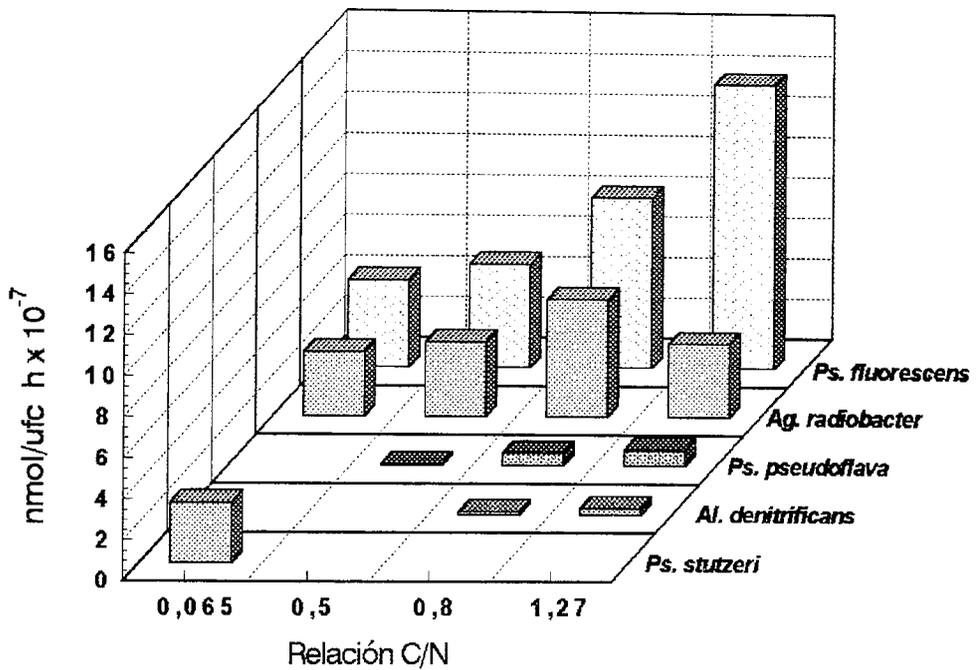
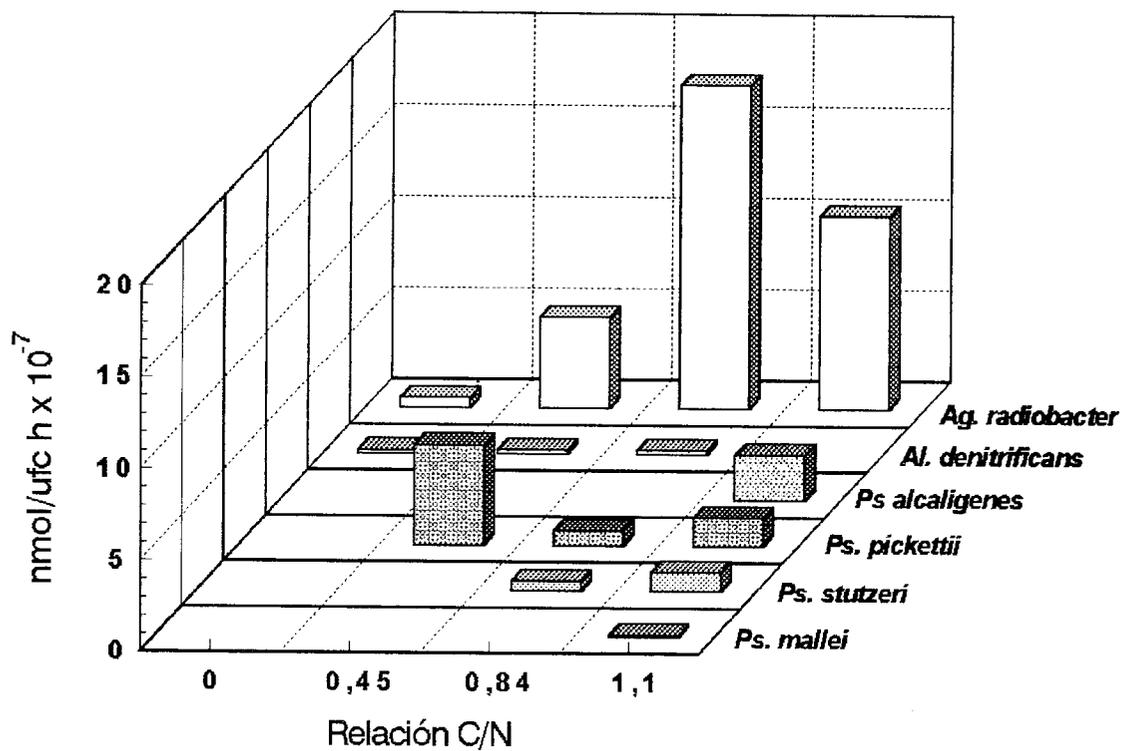


Figura 54. Actividad desnitrificante (nmol/ufc·h) de las cepas aisladas en los ensayos con metanol en presencia de O.D., en función de la relación C/N.

Destacaban en este ensayo los aislamientos de cepas de las especies *Ag. radiobacter* y *Ps. fluorescens*, las cuales presentaban alta actividad desnitrificante. Por lo general la actividad desnitrificantes de cada cepa se incrementaba conforme se aumentaba la dosificación de fuente de carbono.



**Figura 55.** Actividad desnitrificante (nmol/ufc·h) de las cepas aisladas en los ensayos con metanol en ausencia de O.D., en función de la relación C/N.

La figura 55 muestra la actividad que se obtenía para las cepas aisladas en el ensayo sin oxígeno. Estas cepas fueron menos activas, encontrándose el 71.43% de ellas con una actividad inferior a la media. Destacaban nuevamente los aislamientos de cepas de *Ag. radiobacter* por su alta actividad, aislándose en este caso la cepa que presentó la mayor actividad desnitrificante de todas las ensayadas.

Nuevamente se obtuvieron los productos entre la actividad desnitrificante de cada cepa y sus recuentos para cada relación C/N ensayada (figura 56). En este caso no se apreciaba una predominancia de uno de los procesos, obteniendo fases en las que el ensayo con oxígeno presentaba mayor actividad desnitrificante potencial y viceversa.

Hay que destacar que a diferencia de lo sucedido para la sacarosa y el etanol, en este estudio no se observó una fuerte influencia del oxígeno disuelto en el agua sobre la actividad, ya que los procesos con oxígeno, a pesar de tener menores recuentos de microorganismos desnitrificantes, sus cepas eran más activas.

Si comparamos los valores de actividad desnitrificante potencial obtenidos, con los de sacarosa y etanol, estos se asemejaban más a los obtenidos para el etanol, siendo más activos.

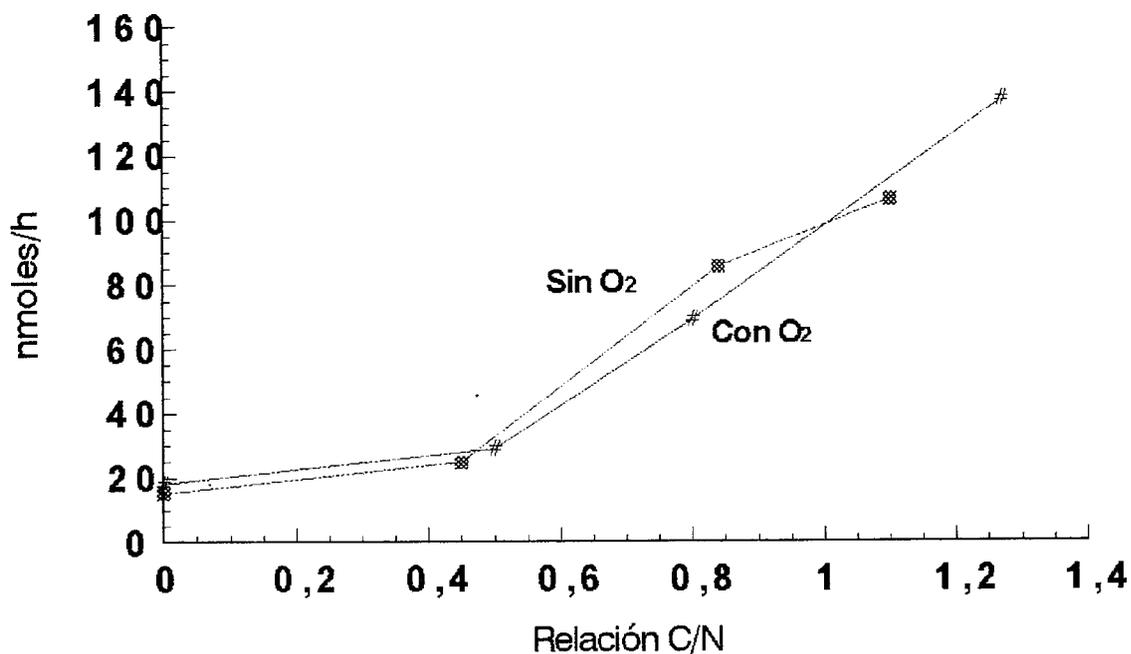


Figura 56. Comparación de las actividades desnitrificantes potenciales obtenidas para los ensayos con metanol.

5.3.- ETANOL

La actividad desnitrificante que manifestaban las cepas aisladas en los procesos, en los que se empleó etanol como fuente de carbono, fue intermedia entre la sacarosa y el metanol. Del total de cepas el 64.3% tenían una actividad desnitrificante inferior a la media y el 21.4% presentaban una alta actividad.

Para esta fuente de carbono y al igual que lo sucedido en los ensayos con sacarosa existían diferencias en la actividad de las cepas en función de la presencia de oxígeno, aunque no tan acusadas. En los ensayos con oxígeno disuelto en el agua a tratar se aislaron cepas más activas, las cuales del total, el 33.3% estaban en el grupo de cepas con alta actividad desnitrificante, frente al 12.5% de las aisladas en los ensayos sin oxígeno.

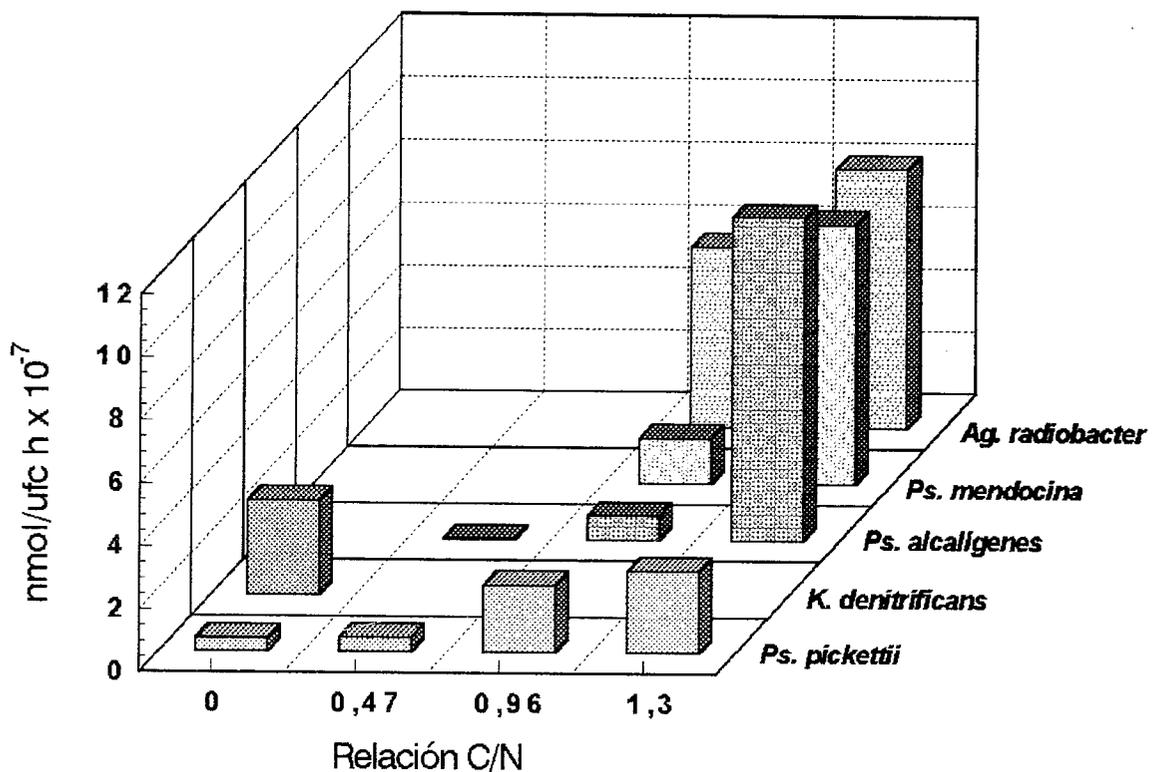
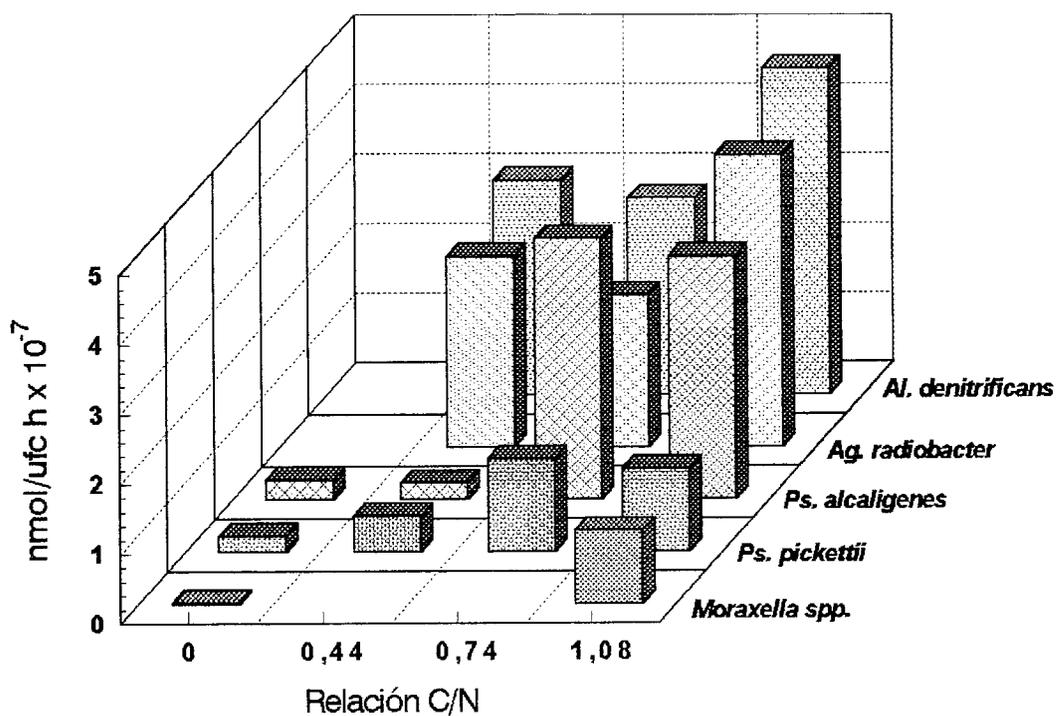


Figura 57. Actividad desnitrificante (nmol/ufc·h) de las cepas aisladas en los ensayos con etanol en presencia de O.D., en función de la relación C/N.

Las cepas aisladas en el proceso con oxígeno (figura 57) presentaban un incremento en su actividad conforme se aumentaba la dosificación de fuente de carbono, aislándose en dichos proceso cepas muy activas de las especies *Ag. radiobacter*, *Ps. mendocina* y *Ps. alcaligenes*.

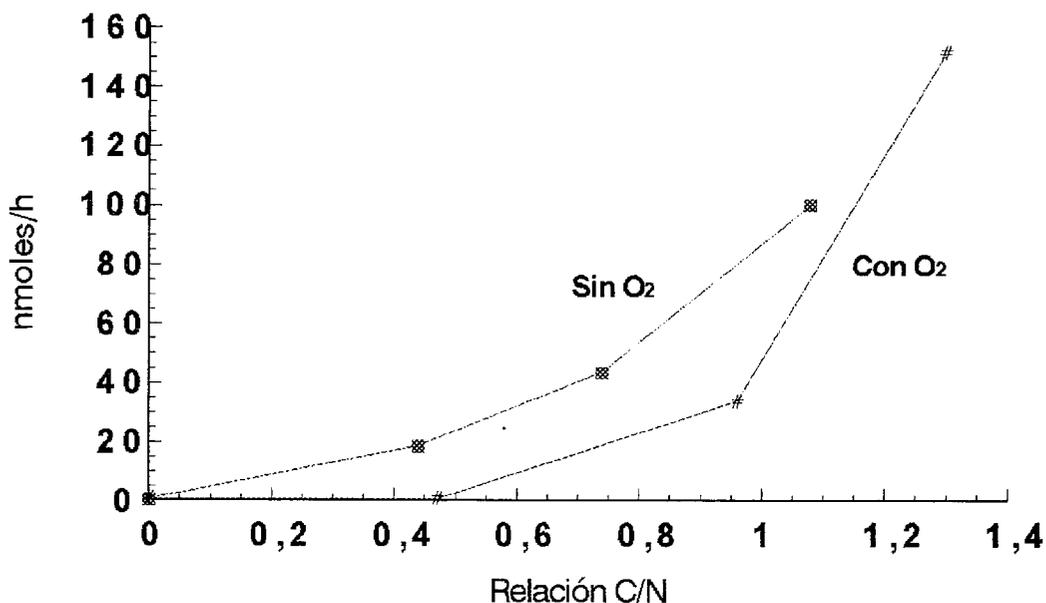
Nuevamente y para los ensayos sin oxígeno disuelto en el agua a tratar, se observó un incremento en la actividad desnitrificante conforme se incrementaba la relación C/N (figura 58), aunque en este ensayo las cepas no destacaran por su alta actividad.



**Figura 58.** Actividad desnitrificante (nmol/ufc·h) de las cepas aisladas en los ensayos con etanol en ausencia de O.D., en función de la relación C/N.

Si apreciamos el producto entre actividad y recuentos, observamos que a pesar de la menor actividad registrada por las cepas aisladas en el proceso sin oxígeno, su mayor número hacían que la actividad desnitrificante potencial fuese superior a la manifestada en la fase con

oxígeno. La actividad potencial que crecía con el incremento de la relación C/N, fue semejante a las manifestadas por el metanol pero al contrario de estas difería de la obtenida en los ensayos con oxígeno (figura 59).



**Figura 59. Comparación de las actividades desnitrificadoras potenciales obtenidas para los ensayos con etanol.**

Si representamos los valores de actividad potencial para el proceso con oxígeno, en función de la actividad presentada por cada una de las cepas aisladas para cada relación C/N (figura 50), observamos que la mayoría de la actividad para altas relaciones C/N le correspondía a Ps. mendocina. Para esta relación, la mayor actividad la presentaban las cepas de Ps. alcaligenes, pero el mayor porcentaje de cepas de Ps. mendocina, hacían predominar a estas por encima del resto. La figura 61 muestra la separación por especies de la actividad potencial para el ensayo sin oxígeno. En ella se aprecia el predominio de la actividad desnitrificadora manifestada por Alcaligenes denitrificans dada por sus mayores recuentos y actividad desnitrificadora.

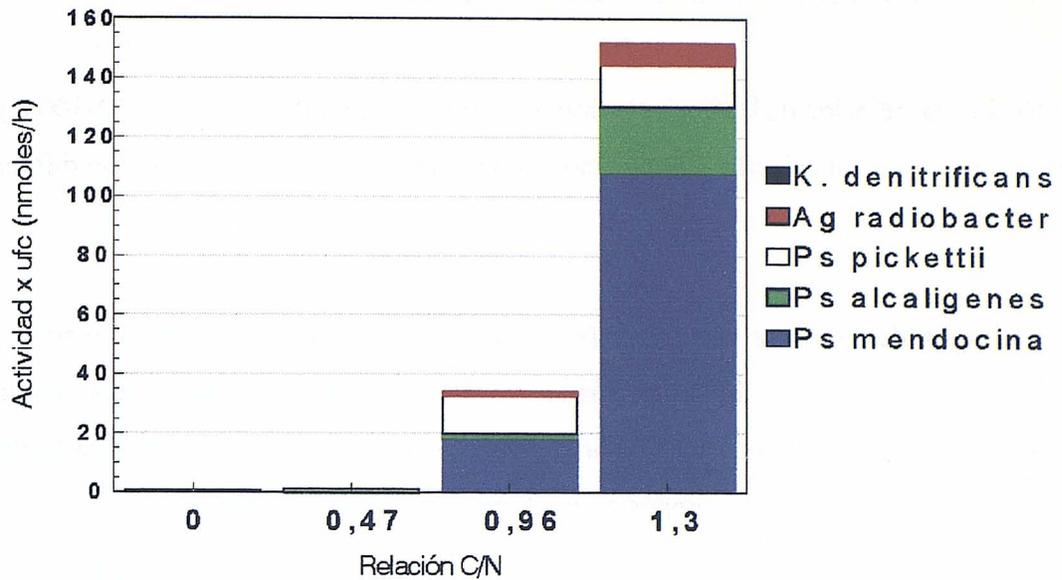


Figura 50. División por especies de la actividad desnitrificante potencial, obtenida en los ensayos con etanol en presencia de O.D.

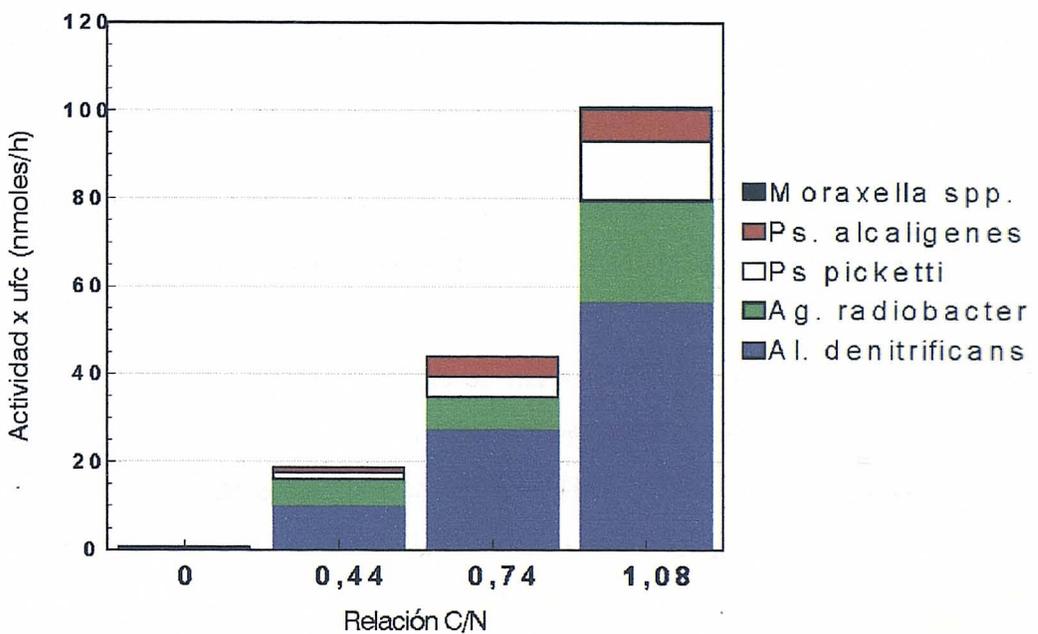


Figura 61. División por especies de la actividad desnitrificante potencial, obtenida en los ensayos con etanol en ausencia de O.D.

## **6.-INFLUENCIA DE LA CARGA DE NITRATO**

Mediante la variación de la concentración de nitrato en el agua de entrada (50-300 mg/l), se pretendía conocer la capacidad de eliminación de nitrógeno de la planta piloto con diferentes cargas.

En el agua de salida se determinó la concentración de nitrato, nitrito y etanol. Las muestras se tomaron a diferentes alturas, estudiando de este modo la capacidad de depuración del lecho biológico en función de su altura y por lo tanto de su volumen. De esta misma forma se muestreó el relleno, estudiando la composición y tamaño de la biopelícula.

### **6.1.- INFLUENCIA DE LA VARIACIÓN DE LA CARGA SUPERFICIAL**

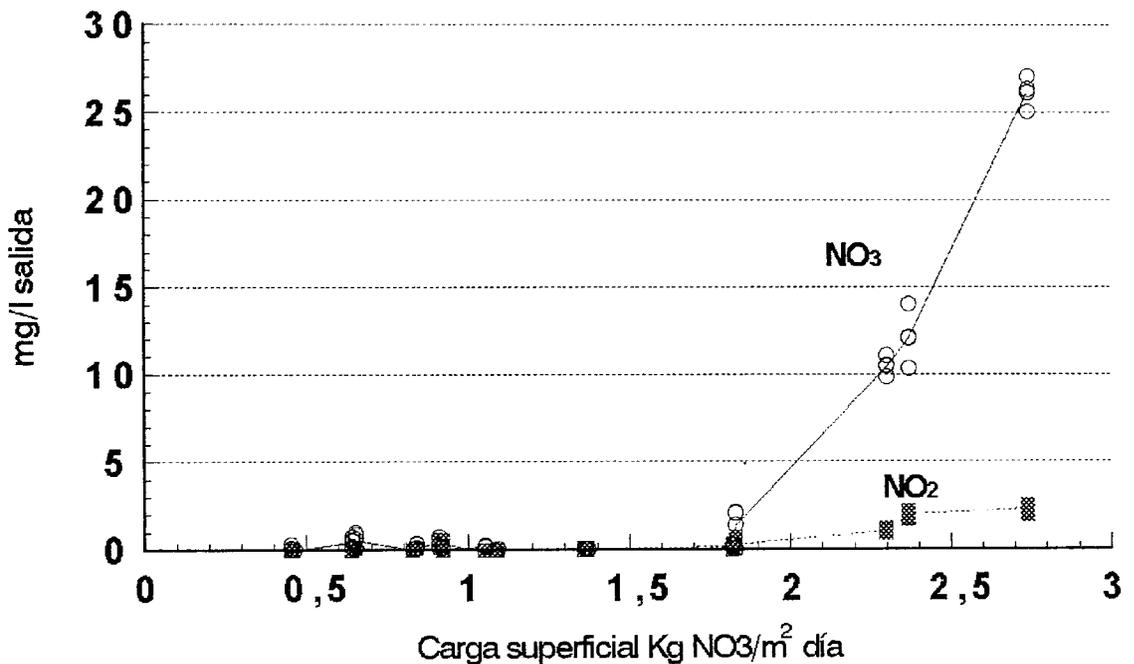
El diámetro del cilindro, que formaba la planta piloto, no era variable, por lo que la superficie era constante, teniendo un valor de 0.0706 m<sup>2</sup>. De este modo, para optimizar la influencia de la carga superficial (Kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/m<sup>2</sup>·día) en el funcionamiento del sistema, se varió la concentración de nitrato en el agua de entrada, manteniendo constante el caudal de trabajo en 27l/h.

Las diferentes concentraciones ensayadas fueron variando desde 50 a 300 mg/l de nitrato, por lo que la carga superficial varió entre 0.45 y 2.74Kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/m<sup>2</sup>·día.

Para cada carga se adicionó la cantidad de etanol necesaria para obtener el máximo rendimiento, que era del 100% en cargas comprendidas entre 0.45 y 1.83 Kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/m<sup>2</sup>·día. Para cargas superiores comenzaban a detectarse en la salida concentraciones de nitrato y nitrito (figura 62) que llegaban a alcanzar un valor de 26.1±1 mg/l y 2.33±0.28 mg/l respectivamente. Para esta carga el máximo rendimiento obtenido fue del 90%.

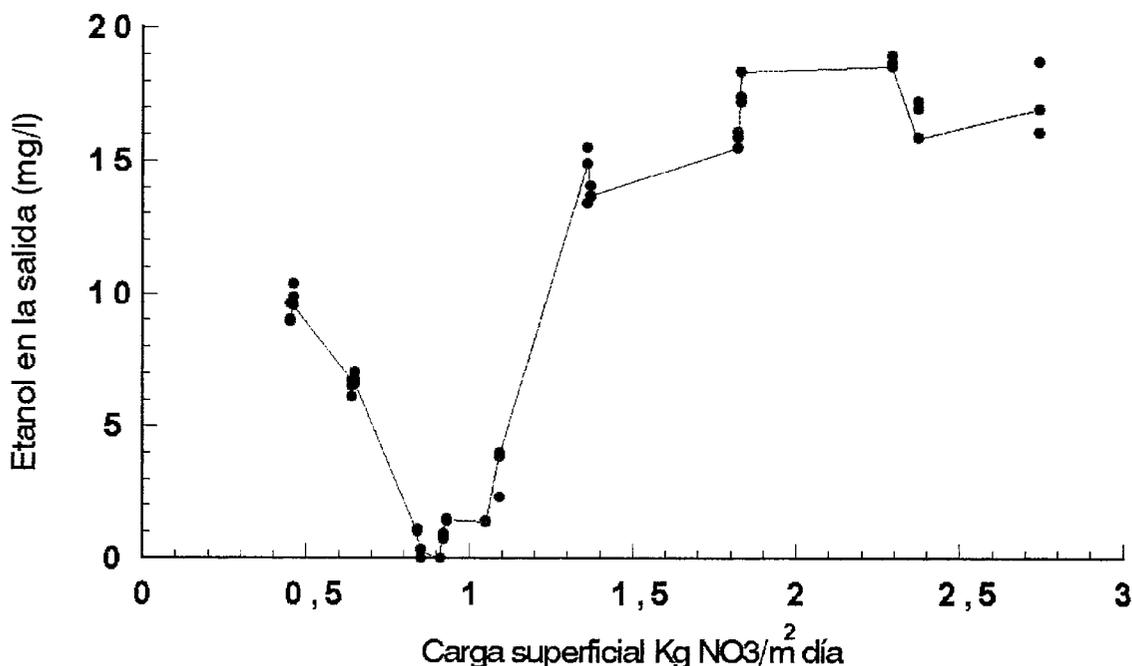
Para la mayoría de las cargas ensayadas se detectaba etanol en el agua de salida. Estas

concentraciones de fuente de carbono tenían un tendencia descendente, hasta hacerse nulo para una carga superficial de 0.91Kg NO<sub>3</sub>/m<sup>2</sup>·día. Para mayores cargas las concentraciones de etanol en el agua tratada comenzaban a aumentar llegando a valores máximos de 19 mg/l, que se registraban entre las cargas 1.83 a 2.74 Kg NO<sub>3</sub>/m<sup>2</sup>·día (figura 63).



**Figura 62.** Concentraciones de nitrato y nitrito en el agua de salida, en función de la carga superficial. Ensayo realizado con la dosificación de etanol necesaria para obtener el máximo rendimiento.

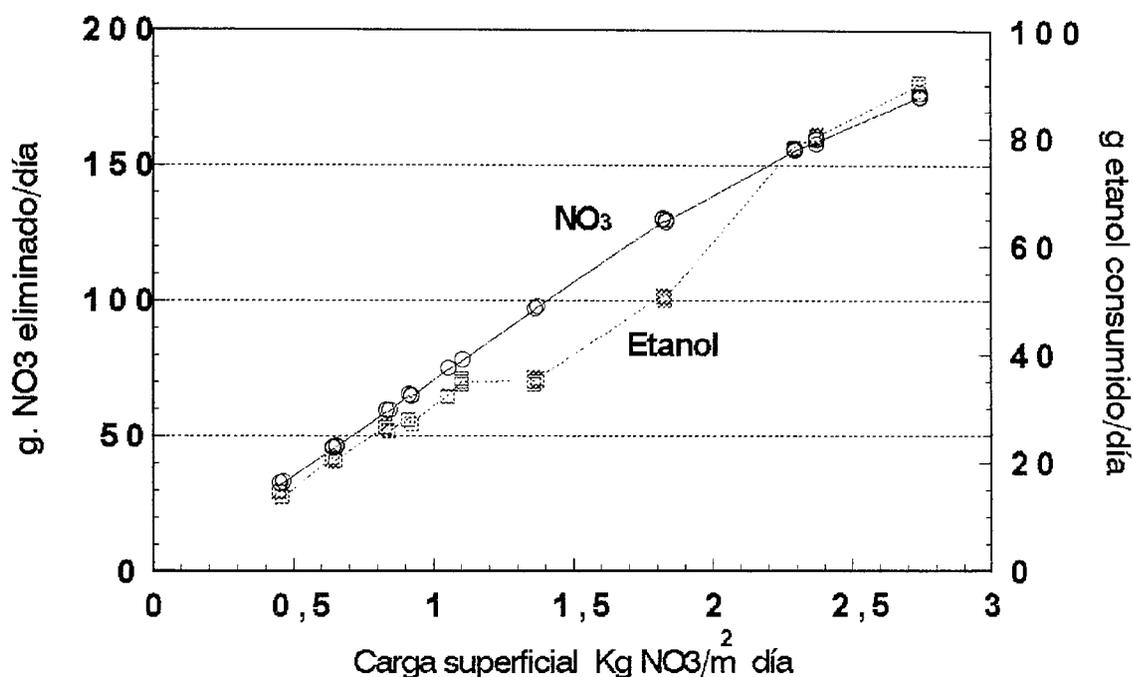
Al margen de los valores de etanol en el agua de salida, la demanda de fuente de carbono crecía conforme se precisaba eliminar mayor cantidad de nitrato. Lógicamente al trabajar al máximo rendimiento, la concentración de nitrato eliminado crecía conforme se aumentaba la carga superficial. Paralelo a este crecimiento, aumentaba la cantidad de etanol consumido, pero dicha cantidad no fue igual para todas las cargas superficiales ensayadas.



**Figura 63.** Concentraciones de etanol en el agua de salida, para las diferentes cargas superficiales ensayadas. Ensayo realizado con adiciones de etanol adecuadas para obtener el máximo rendimiento.

La concentración de etanol aumentaba paralelamente a la cantidad de nitrato eliminado, manteniendo una relación media de  $0.44 \pm 0.015$  unidades de etanol por cada unidad de nitrato eliminado. Esta relación se mantenía entre las cargas 0.46 hasta 1.1 Kg NO<sub>3</sub>/m<sup>2</sup>·día, descendiendo, para cargas superiores, hasta un valor de  $0.375 \pm 0.017$  unidades de etanol por unidad de nitrato eliminado. esta relación se mantuvo hasta la carga 1.83 Kg NO<sub>3</sub>/m<sup>2</sup>·día.

Para cargas superiores a 1.83 Kg NO<sub>3</sub>/m<sup>2</sup>·día, no se obtenía el 100% de eliminación de nitrógeno, por lo que comenzaba a detectarse en el agua tratada ciertas concentraciones, tanto de nitrato como de nitrito. Los valores de fuente de carbono incrementaban para estas cargas (figura 64), aumentando por ello la relación etanol consumido/nitrato eliminado hasta el valor de  $0.51 \pm 0.004$ .



*Figura 54. Variación del nitrato eliminado y el carbono consumido con el incremento de la carga superficial. Ensayo realizado con la adición de etanol adecuado para obtener el máximo rendimiento.*

### 6.1.- ESTUDIO A DIFERENTES ALTURAS DE LA INFLUENCIA DE LA CARGA SUPERFICIAL.

Para las cargas superficiales 0.46, 0.93, 1.39, 1.85 y 2.31 Kg NO<sub>3</sub>/m<sup>2</sup>-día se tomaron muestras de agua a diferentes alturas, estudiando las concentraciones de nitrato y nitrito en ellas. En la tabla 32 se refleja el análisis de varianza realizado para cada altura en función de las concentraciones de nitrógeno presentes en cada una, según la carga ensayada. Había diferencias estadísticamente significativas para las concentraciones de nitrógeno presentes en cada altura (P< 0.001). Por otro lado y atendiendo al test t de Student (P<0.05) se observa como entre las alturas 123 cm y 200 cm había un comportamiento semejante en cuanto a las concentraciones de nitrato presentes para las diferentes cargas superficiales. El resto de alturas presentaban concentraciones diferentes entre si.

**Tabla 32. Análisis de Varianza y test t de Student realizado para las concentraciones de nitrógeno presentes en las diferentes alturas de la columna en función de la carga superficial.**

<b>Análisis de varianza</b>					
<b>Fuente de variación</b>	<b>g.l.</b>	<b>Suma de los cuadrados</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F-calculada</b>	<b>Nivel de significancia</b>
Cargas	4	14008.4	3502.09	79.30	P<0.001
Altura	4	5244.41	1311.1	29.69	P<0.001
Total (corregido)	74	22167.4			

<b>Test t de Student (P&lt;0.05)</b>		
<b>Altura</b>	<b>Media</b>	<b>Grupo</b>
200	0.6248	a
123	2.6593	a
66	10.3047	b
10	28.7881	c
0	34.058	d

La altura que mayores concentraciones de nitrógeno presentaba era 10 cm, continuada de 66 cm, descendiendo para el resto considerablemente para el resto. Entre estas dos alturas se producía la mayor eliminación de nitrato, justo lo contrario que entre 123 y 200 cm, las cuales no diferían estadísticamente entre si (P<0.05). Esto hacía suponer una escasa eliminación de nitrato en esta zona.

Si nos fijamos en la evolución de las concentraciones de nitrato y nitrito para la carga 0.46 Kg NO<sub>3</sub>/m<sup>2</sup>·día (figura 65), se observa como había una importante caída de la concentración de nitrato en los 66 primeros cm de columna, alcanzando un valor de 3.18±0.23 mg/l. Las concentraciones de nitrito no superaron la concentración de 1 mg/l y el etanol se consumía en esta primera zona en el 48%, quedando en la salida un 32% del total adicionado.

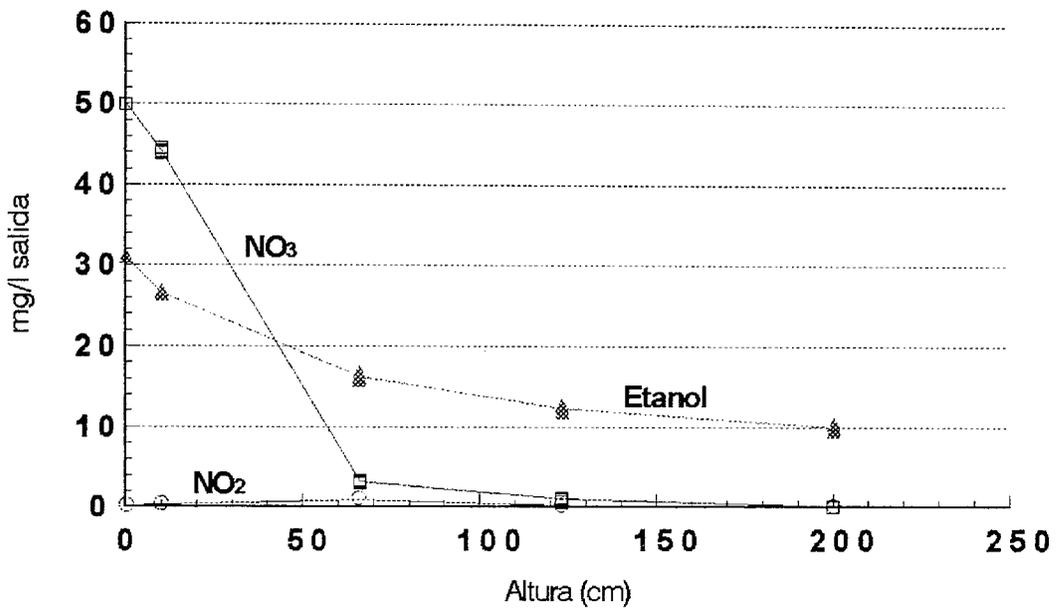


Figura 65. Variación de las concentraciones de nitrato, nitrito y etanol, en función de la altura del lecho biológico, para la carga 0.43 Kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/m<sup>2</sup>·día.

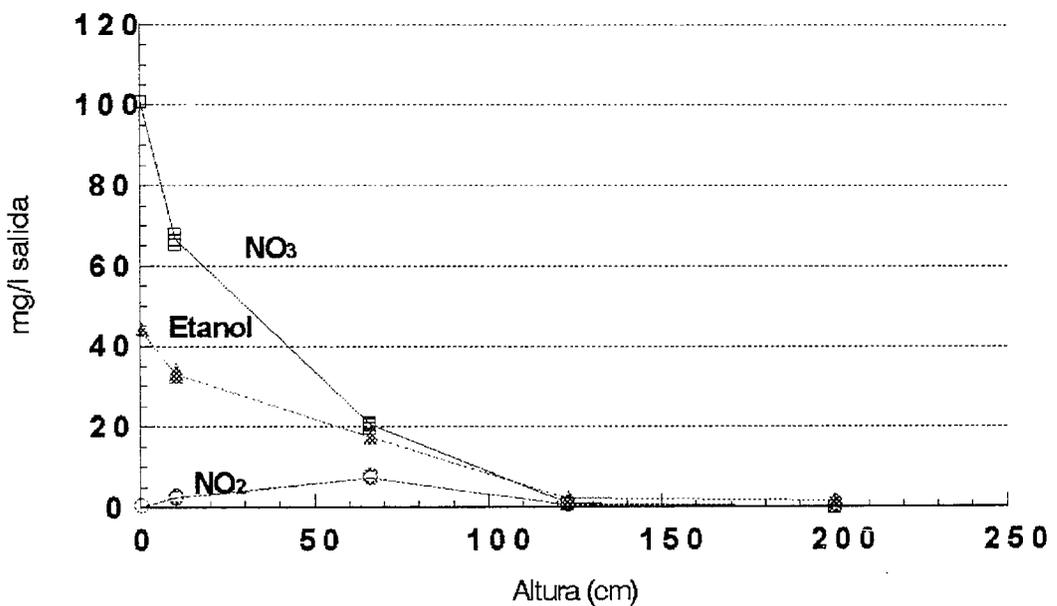
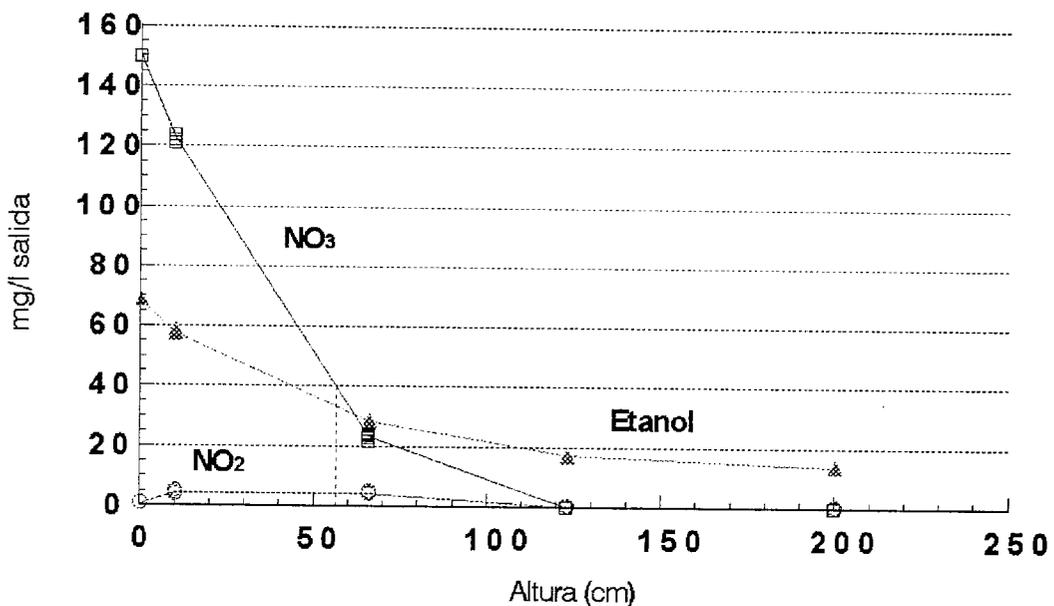


Figura 66. Variación de las concentraciones de nitrato, nitrito y etanol, en función de la altura del lecho biológico, para la carga 0.93 Kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/m<sup>2</sup>·día.

Para la carga  $0.93 \text{ Kg NO}_3^-/\text{m}^2\cdot\text{día}$  (figura 66) el comportamiento fue semejante, a excepción de la fuente de carbono que para la altura 123 cm se había consumido prácticamente toda. En este caso si se alcanzó una concentración de nitrito más alta, alcanzando un valor de  $7.38\pm 0.37 \text{ mg/l}$  para la altura 66 cm. En esta altura ya se había eliminado el 70% del total del nitrógeno de entrada, quedando un 30% que se consumiría en los siguientes 57 cm (altura 123).

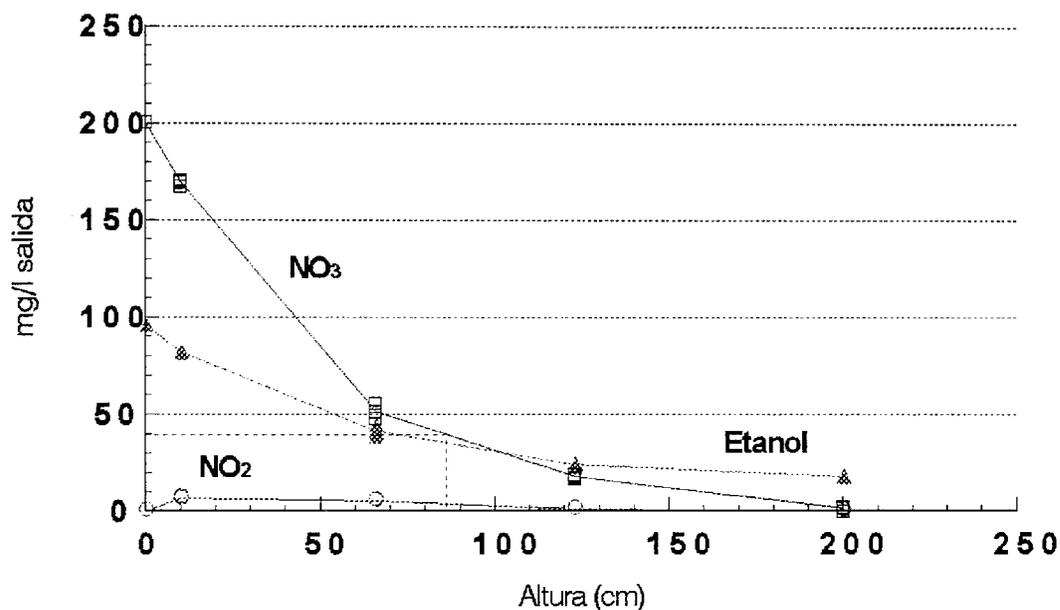
Igualmente para la carga  $1.39 \text{ Kg NO}_3^-/\text{m}^2\cdot\text{día}$  (figura 67) en los primeros 66 cm ya se había eliminado el 81% del nitrógeno total. En este ensayo los valores máximos de nitrito oscilaron en torno a  $4.3\pm 0.57 \text{ mg/l}$  y no se consumía totalmente el etanol, apareciendo en la salida un 20% del total adicionado.



**Figura 67. Variación de las concentraciones de nitrato, nitrito y etanol, en función de la altura del lecho biológico, para la carga  $1.39 \text{ Kg NO}_3^-/\text{m}^2\cdot\text{día}$ .**

Ya para la carga  $1.85 \text{ Kg NO}_3^-/\text{m}^2\cdot\text{día}$  (figura 68) aparecía en la salida cierta concentración de nitrato y nitrito, siendo estas de  $1.36\pm 1.18 \text{ mg/l}$  y  $0.11\pm 0.05 \text{ mg/l}$  respectivamente, por lo que no se eliminaba por completo en los 2.0 m de altura del lecho. La tendencia fue semejante a las

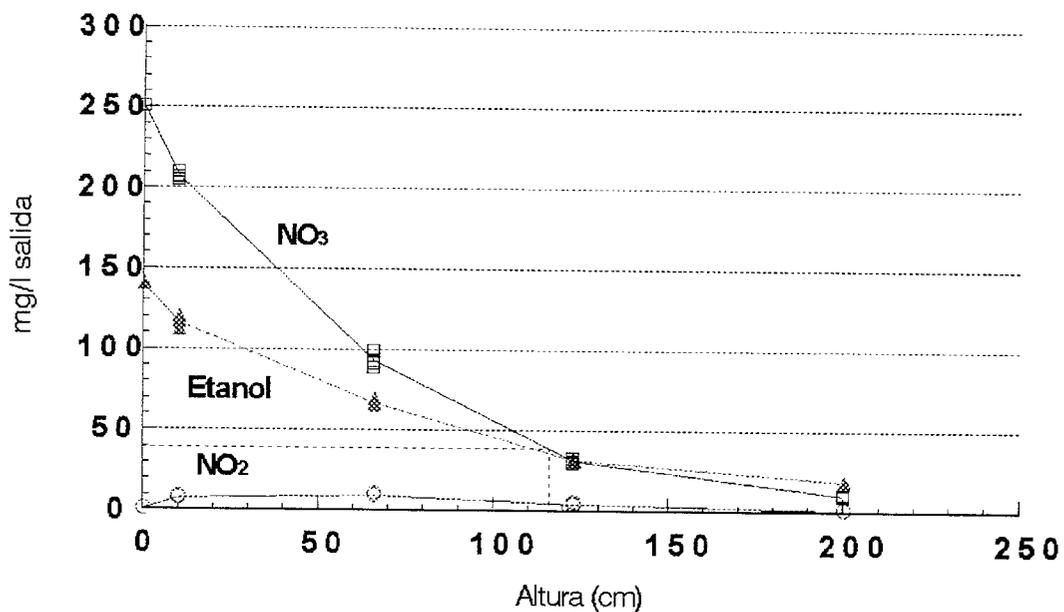
cargas anteriores eliminándose en los 66 primeros centímetros el 71% del nitrógeno de entrada y el resto se consumía a lo largo de los 134 centímetros restantes. Nuevamente no se consumía totalmente el etanol, quedando en la salida un valor de  $17.69 \pm 0.61$  mg/l, un 18% del dosificado.



**Figura 68.** Variación de las concentraciones de nitrato, nitrito y etanol, en función de la altura del lecho biológico, para la carga  $1.85 \text{ Kg NO}_3^-/\text{m}^2 \cdot \text{día}$ .

La mayor carga superficial, ensayada para su comportamiento a diferentes alturas, fue  $2.31 \text{ Kg NO}_3^-/\text{m}^2 \cdot \text{día}$  (figura 69). En este caso las concentraciones de nitrato y nitrito de salida fueron de  $10.43 \pm 0.6 \text{ mg/l}$  y  $1.033 \pm 0.15 \text{ mg/l}$  respectivamente, no siendo suficientes los 2.0 metros de lecho para eliminarlos por completo. Igualmente el etanol no se consumió por completo, encontrándose una concentración de  $18.76 \pm 0.21 \text{ mg/l}$  en el agua tratada (13.4% del adicionado). Para este ensayo se alcanzaban las mayores concentraciones de nitrito, para la altura de 66 cm, las cuales eran de  $9.3 \pm 0.7 \text{ mg/l}$ . Si comparamos la cantidad eliminada de nitrato por centímetro de lecho biológico, se observa como la parte baja de la columna era la más efectiva. Para la carga  $2.31 \text{ Kg NO}_3^-/\text{m}^2 \cdot \text{día}$ , en los 10 primeros centímetros se eliminaba un total de 22.49 g

$\text{NO}_3^-$ / día lo cual suponía un total de  $2.25 \text{ g NO}_3^-/\text{día}\cdot\text{cm}$ . Este valor era superior al obtenido para los siguientes 56 cm (altura 66 cm), en los que se eliminaba un total de  $72.17 \text{ g NO}_3^-/\text{día}$ , suponiendo un valor de  $1.29 \text{ g NO}_3^-/\text{día}\cdot\text{cm}$ . Para mayores alturas estos valores descendían hasta  $0.78 \text{ g NO}_3^-/\text{día}\cdot\text{cm}$  para la altura 123 cm y tan solo  $0.21 \text{ g NO}_3^-/\text{día}\cdot\text{cm}$  para los restantes 77 cm (altura 200 cm).



**Figura 69. Variación de las concentraciones de nitrato, nitrito y etanol, en función de la altura del lecho biológico, para la carga  $2.31 \text{ Kg NO}_3^-/\text{m}^2\cdot\text{día}$ .**

Estas tendencias seguían manteniéndose para menores cargas. Así para la carga  $1.85 \text{ Kg NO}_3^-/\text{m}^2\cdot\text{día}$ , la mayor eliminación seguía obteniéndose en los 10 primeros centímetros con un valor de  $1.43 \text{ g NO}_3^-/\text{día}\cdot\text{cm}$ , algo semejante al de los siguientes 56 cm que tenían un valor de eliminación de  $1.38 \text{ g NO}_3^-/\text{día}\cdot\text{cm}$ . Los valores más bajos seguían dándose para mayores alturas alcanzando valores de  $0.45 \text{ g NO}_3^-/\text{día}\cdot\text{cm}$  y  $0.15 \text{ g NO}_3^-/\text{día}\cdot\text{cm}$ , para 123 y 200 cm respectivamente.

Para menores cargas superficiales, las alturas superiores a 123 cm no presentaban prácticamente actividad, concentrándose esta casi en su totalidad en los 66 primeros centímetros del sistema.

### **6.3,. VARIACIONES EN EL TAMAÑO DE LA BIOPELÍCULA EN FUNCIÓN DE LA CARGA SUPERFICIAL.**

Para los diferentes datos obtenidos en los muestreos de biopelícula se realizó un análisis de varianza (tabla 33), con el objeto de ver la variación del valor de tamaño con respecto a la carga superficial ensayada y a la altura del lecho biológico.

**Tabla 33. Análisis de Varianza y test t de Student realizado para los tamaños de biopelícula determinados para las diferentes alturas de la columna y la carga superficial ensayada.**

<b>Análisis de varianza</b>					
<b>Fuente de variación</b>	<b>g.l.</b>	<b>Suma de los cuadrados</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F-calculada</b>	<b>Nivel de significancia</b>
Cargas	4	388.967	97.2417	54.44	P<0.001
Altura	2	495.71	247.855	138.76	P<0.001
Total (corregido)	44	952.552			

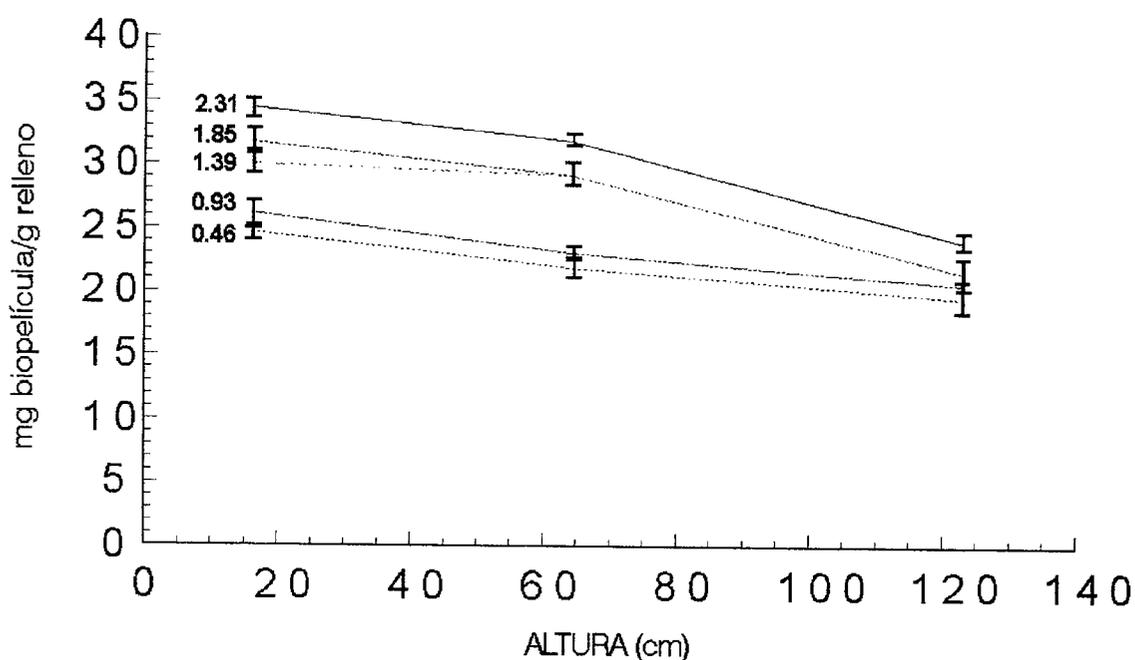
  

<b>Test t de Student (P&lt;0.05)</b>					
<b>Carga</b>	<b>Media</b>	<b>Grupo</b>	<b>Altura</b>	<b>Media</b>	<b>Grupo</b>
0.46	22.0578	a	123	21.4973	a
0.93	23.289	a	64	27.0667	b
1.39	26.9556	b	16	29.3953	c
1.85	27.5	b			
2.31	30.13	c			

Tanto para las cargas como para las alturas se obtenían valores de tamaño de biopelícula con diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Ninguna de las tres altura muestreadas presentaba valores de biopelícula semejantes, siendo estos menores cuanto mayor fuese la altura

de muestreo. Esto se repetía independientemente de la carga superficial ensayada.

En cuanto al tamaño de biopelícula en función de las cargas superficiales ensayadas, se observaba cierta semejanza entre los valores obtenidos para las cargas 0.46 y 0.93 Kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/m<sup>2</sup>·día y 1.39 y 1.85 Kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/m<sup>2</sup>·día, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos para dichas cargas.



**Figura 70. Variación del tamaño de la biopelícula en función de la carga superficial ensayada y la altura de muestreo. Las barras representan la desviación estándar.**

En la figura 70 se representan las variaciones del tamaño de la biopelícula, las cuales aumentaban conforme crecía la carga ensayada y descendían con la altura. La variación entre la parte baja de la columna (16 cm) y la parte alta (123 cm) oscilaba entre el 20.5 y el 32% menos del tamaño que alcanzaba la biopelícula en dicha parte baja. Este porcentaje se incrementaba conforme mayor era la carga superficial ensayada, lo que manifestaba un mayor crecimiento de

la biopelícula en la parte baja que en la parte alta conforme se aumentaba la carga superficial.

**6,4.- VARIACIONES EN HETERÓTROFOS CAPACES DE CRECER EN AUSENCIA DE OXÍGENO (HAO), EN FUNCIÓN DE LA CARGA SUPERFICIAL.**

Los recuentos de HAO realizados variaban en función de la altura de muestreo y de la carga superficial, existiendo entre ellos diferencias estadísticamente significativas, tal como se refleja en la tabla 34.

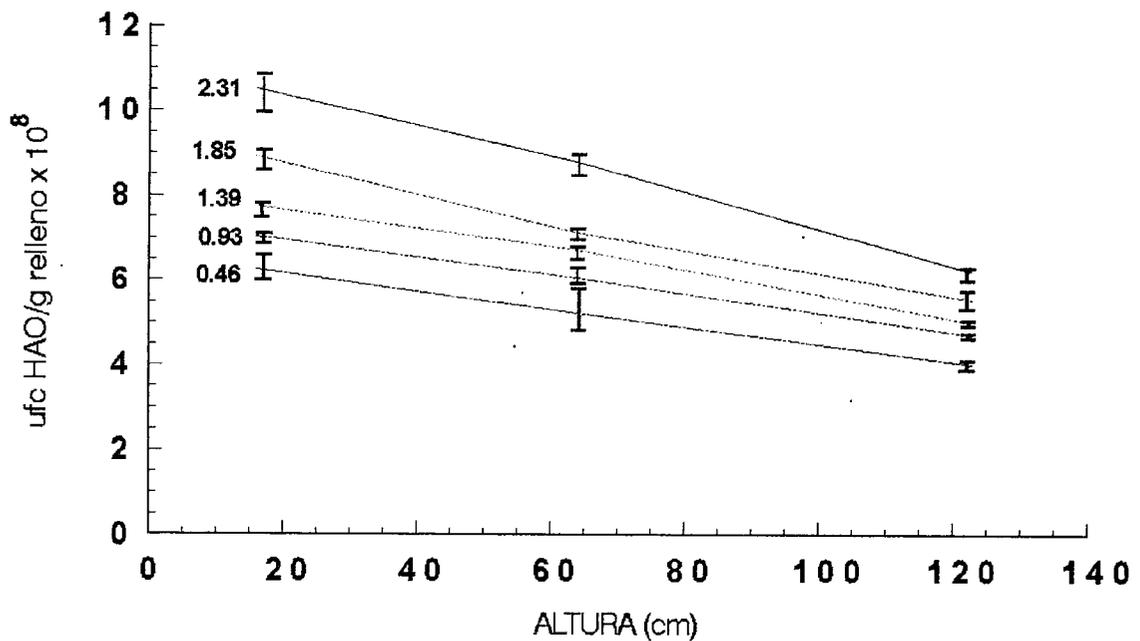
**Tabla 34 Análisis de Varianza y test t de Student realizado para los recuentos de HAO, determinados para las diferentes alturas de la columna y la carga superficial ensayada.**

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Cargas	4	8.9103e <sup>17</sup>	2.2275e <sup>17</sup>	276.73	P<0.001
Altura	2	3.4622e <sup>17</sup>	1.7311e <sup>17</sup>	215.05	P<0.001
Total (corregido)	44	1.2678e <sup>18</sup>			

Test t de Student (P<0.05)					
Carga	Media	Grupo	Altura	Media	Grupo
0.46	5.177e <sup>8</sup>	a	123	5.955e <sup>8</sup>	a
0.93	5.935e <sup>8</sup>	b	64	6.966e <sup>8</sup>	b
1.39	6.486e <sup>8</sup>	c	16	8.102e <sup>8</sup>	c
1.85	7.208e <sup>8</sup>	d			
2.31	8.512e <sup>8</sup>	e			

Al diferencia de lo que sucedía con los estudios sobre tamaño de la biopelícula, para los recuentos de HAO no se observaban asociaciones de comportamiento para ninguna de las cargas ensayadas. En este caso también había un crecimiento en los recuentos conforme crecía la carga superficial ensayada, tal como se observa en la figura 71.

Con respecto a la altura, había un descenso en los recuentos conforme se ascendía por la columna, variando los valores registrados en la parte superior (123 cm) entre un 33 y un 41%. Las mayores diferencias se observaban para las mayores cargas ensayadas, para las cuales se puede apreciar una mayor diferencia entre los recuentos al principio y al final de la columna.



*Figura 71. Variación de los recuentos de HAO en función de la carga superficial ensayada y la altura de muestreo. Las barras representan la desviación estándar.*

#### **6,5.- VARIACIONES DE BACTERIAS DESNITRIFICANTES, EN FUNCIÓN DE LA CARGA SUPERFICIAL.**

Los recuentos de bacterias desnitrificantes realizados a diferentes alturas y para diferentes cargas presentaban valores con diferencias estadísticamente significativas, tanto para las diferentes cargas superficiales ensayadas como para las diferentes alturas.

Los recuentos crecían conforme se aumentaba la carga superficial, obteniendo los

máximos valores para la carga 2.31 Kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ m<sup>2</sup>·día, según se observa en el test t de Student representado en la tabla 35.

**Tabla 35 Análisis de Varianza y test t de Student realizado para los recuentos de bacterias desnitrificantes, determinados para las diferentes alturas de la columna y la carga superficial ensayada.**

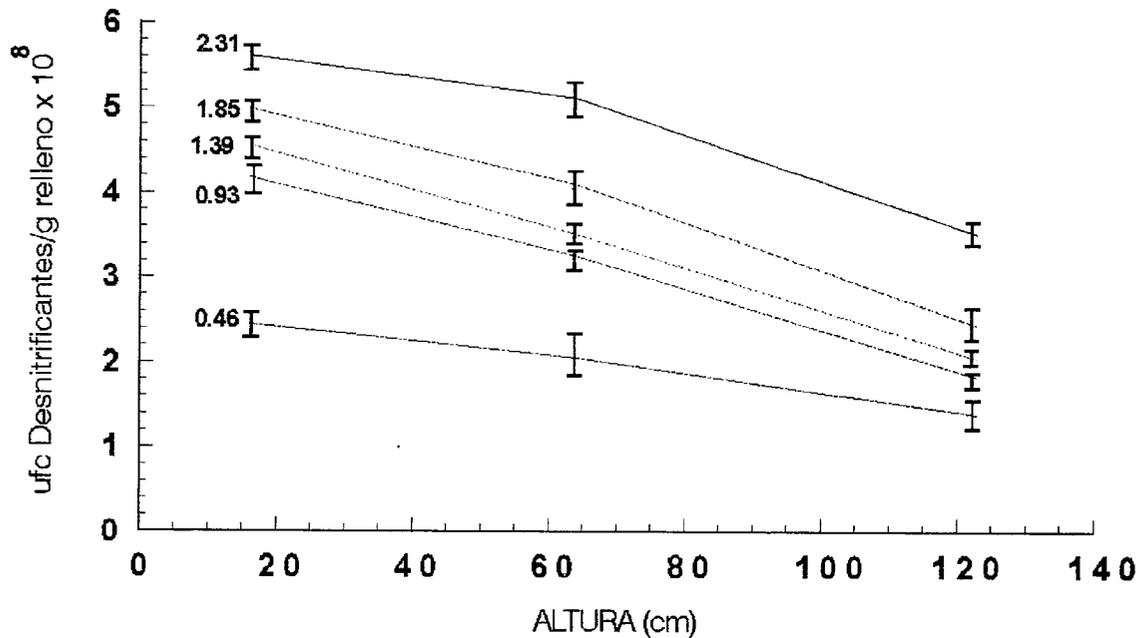
Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Cargas	4	5.9802e <sup>17</sup>	1.4950e <sup>17</sup>	166.72	P<0.001
Altura	2	2.6646e <sup>17</sup>	1.3323e <sup>17</sup>	148.58	P<0.001
Total (corregido)	44	8.9856e <sup>18</sup>			

Test t de Student (P<0.05)					
Carga	Media	Grupo	Altura	Media	Grupo
0.46	1.974e <sup>8</sup>	a	123	2.259e <sup>8</sup>	a
0.93	3.095e <sup>8</sup>	b	64	3.620e <sup>8</sup>	b
1.39	3.384e <sup>8</sup>	c	16	4.363e <sup>8</sup>	c
1.85	3.854e <sup>8</sup>	d			
2.31	4.762e <sup>8</sup>	e			

En la figura 72 se representan las variaciones en los recuentos de bacterias desnitrificantes. Para las cinco cargas ensayadas se observaba un descenso en los recuentos que fue menos pronunciado para la carga 0.46 Kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ m<sup>2</sup>·día, la cual presentaba los menores recuentos, suponiendo estos un 58% menos que los registrados para la carga 2.31 Kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ m<sup>2</sup>·día.

Los recuentos obtenidos para la parte alta de la columna eran inferiores a los de las partes bajas, oscilando entre un 37 y un 56% menos. En este estudio y a diferencia de los datos obtenidos para otros no se observaba un incremento en los porcentajes conforme se aumentaba la carga superficial, sucediendo más bien todo lo contrario. Así para la carga 2.31 Kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ m<sup>2</sup>·día el crecimiento en la parte superior fue mayor que para el resto de cargas superficiales, a diferencia

de lo que sucedía para los recuentos de HAO.



*Figura 72. Variación de los recuentos de bacterias desnitrificantes en función de la carga superficial ensayada y la altura de muestreo. Las barras representan la desviación estándar.*

#### **6.6.- VARIACIONES DE BACTERIAS REDUCTORAS DE NITRATO, EN FUNCIÓN DE LA CARGA SUPERFICIAL.**

Los recuentos de bacterias reductoras de nitrato realizados a diferentes alturas del lecho biológico, presentaban diferencias estadísticamente significativas entre ellos, tal como se refleja en la tabla 36. No se observaba lo mismo para los valores obtenidos en función de las diferentes cargas superficiales ensayadas.

Los recuentos crecían conforme se aumentaba la carga superficial, pero este crecimiento no fue tan significativo como el observado para el resto de comunidades bacterianas ensayadas. Los máximos recuentos se obtuvieron para las cargas 1.39 y 2.31 Kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ m<sup>2</sup>·día, entre los

cuales no se apreciaban diferencias.

**Tabla 36 Análisis de Varianza y test t de Student realizado para los recuentos de bacterias reductoras de nitrato, determinados para las diferentes alturas de la columna y la carga superficial ensayada.**

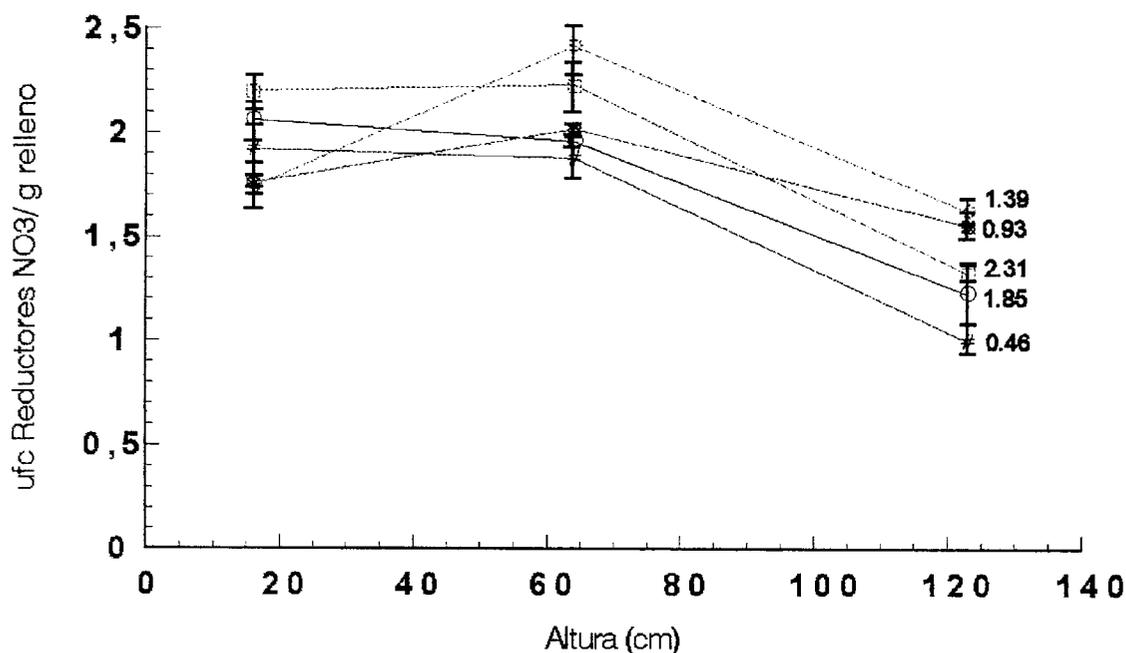
Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Cargas	4	6.8225e <sup>15</sup>	1.7056e <sup>15</sup>	3.92	P<0.92
Altura	2	4.6628e <sup>16</sup>	2.3314e <sup>16</sup>	53.60	P<0.001
Total (corregido)	44	6.9980e <sup>16</sup>			

Test t de Student (P<0.05)					
Carga	Media	Grupo	Altura	Media	Grupo
0.46	1.597e <sup>8</sup>	a	123	1.353e <sup>8</sup>	a
1.85	1.754e <sup>8</sup>	ab	16	1.943e <sup>8</sup>	b
0.93	1.788e <sup>8</sup>	ab	64	2,101e <sup>8</sup>	b
2.31	1.922e <sup>8</sup>	b			
1.39	1.933e <sup>8</sup>	b			

En la figura 73 se representan las variaciones en los recuentos de bacterias reductoras de nitrato, observándose como no había homogeneidad en los crecimientos, tal como sucedía para el resto de comunidades bacterianas estudiadas. Para las cargas 0.93, 1.39 y 2.31 Kg NO<sub>3</sub>/m<sup>2</sup>·día, se observaba un incremento en los recuento entre la altura 16 cm y 64 cm, para la cual presentaban los mayores valores. En el resto de cargas se observaba un leve descenso, lo cual hacía que entre la altura 16 y 64 cm no existieran diferencia significativas en los valores de reductores de nitrato. Para la altura 123 cm si se detectaba un descenso de los valores que suponía entre un 23 y un 46 % menos que los valores obtenidos para la altura 64 cm.

El comportamiento de los recuentos con respecto a las cargas superficiales ensayadas, no

seguía un carácter creciente conforme se aumentaba la concentración de nitrato en el agua a tratar, observando que los menores recuentos si se obtenían para la carga 0.46 Kg NO<sub>3</sub>/ m<sup>2</sup>·día. Los valores medios obtenidos para las cinco cargas ensayadas, no diferían entre si de modo considerable, oscilando entre 2.42·10<sup>8</sup> ufc/ g de relleno y 1.0·10<sup>8</sup> ufc/ g relleno.



*Figura 73. Variación de los recuentos de bacterias reductoras de nitrato en función de la carga superficial ensayada y la altura de muestreo. Las barras representan la desviación estándar.*

## 7.-INFLUENCIA DE LA VARIACIÓN DE CAUDAL

Con la idea de conocer la posible influencia del crecimiento del caudal de trabajo, este se varió entre 13. 8 l/h y 54 l/h. Al ser la superficie del cilindro fija la variación de la carga hidráulica se debía al aumento del caudal, oscilando esta entre 4.68 y 18.33 m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>·día.

Tanto el tiempo de retención como la carga superficial de nitrato variaban al aumentar el caudal, permaneciendo constante la concentración de nitrato de entrada en 100 mg/l. El primero descendía y la carga aumentaba al pasar mayor cantidad de nitrato/día a través de la columna. Esta oscilación estaba entre 0.47 y 1.86 Kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/m<sup>2</sup>·día.

Las muestras del agua de salida se tomaron a diferentes alturas, determinando en ellas la concentración de nitrato, nitrito y etanol. De este modo se estudiaba la capacidad de depuración del lecho biológico a diferentes alturas. Igualmente se muestreó el relleno, estudiando la composición y tamaño de la biopelícula. La toma de muestra se realizó a diferentes alturas, conociendo así la variación de la biopelícula con la altura.

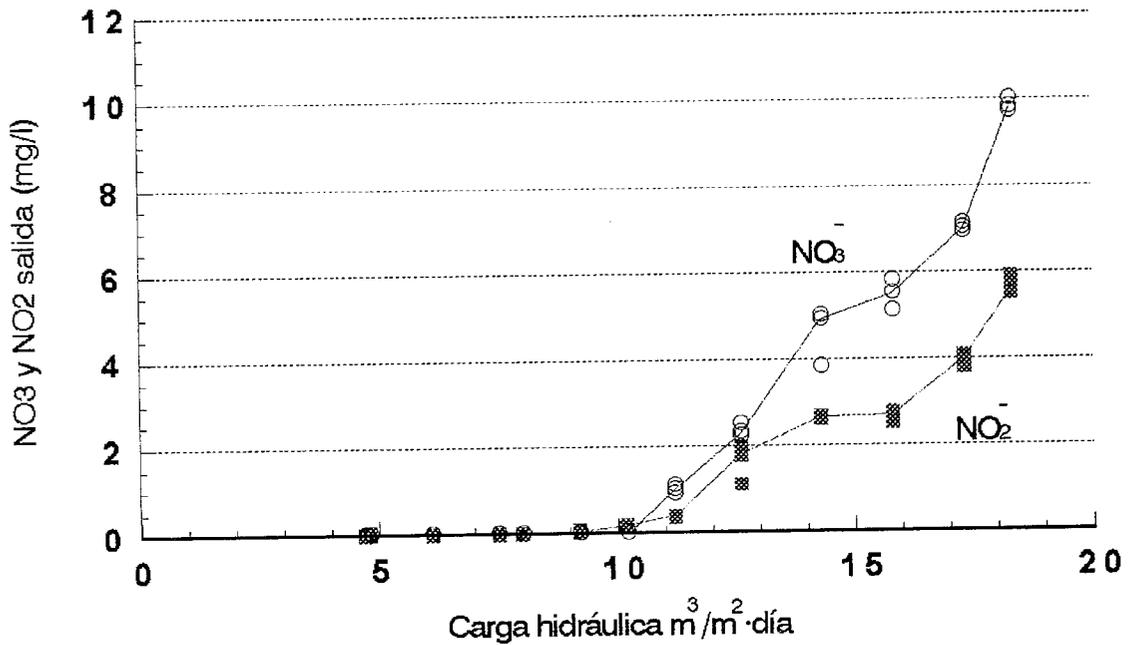
### **7.1.- INFLUENCIA DE LA VARIACIÓN DE LA CARGA HIDRÁULICA**

Para cada carga hidráulica ensayada se adicionó la cantidad de etanol necesaria para obtener el máximo rendimiento, el cual fue del 100% para las cargas comprendidas entre 4.68 y 10.18 m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>·día. Si lo expresamos en carga superficial de nitrato la oscilación fue entre 0.47 y 1.02 Kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/m<sup>2</sup>·día. Estos valores fueron más bajos que cuando se incrementaba la concentración de nitrato en el agua de entrada.

Para cargas hidráulicas superiores se detectaba en el agua de salida concentraciones de nitrato y nitrito (figura 74) que aumentaban si se incrementaba más el caudal. Los valores más altos se detectaban para la mayor carga superficial ensayada, siendo estos de 9.83±0.15 mg/l para nitrato y 5.66±0.21 mg/l para el nitrito. El máximo rendimiento alcanzado en este punto fue del 82.9%, para una carga superficial de 1.86 Kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/m<sup>2</sup>·día, para la cual se observaba un mayor rendimiento en los ensayos de variación de la concentración de nitrato de entrada.

Al contrario de lo que sucedía en los ensayos con variación de la concentración de nitrato en el agua a tratar, para la variación del caudal no se detectaba etanol en el agua de salida, hasta una carga hidráulica de 11.2 m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>·día. A partir de esta carga, la concentración de etanol se

incrementaba, alcanzando un máximo de  $13.39 \pm 0.96$  mg/l para una carga de  $18.33$  m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>·día (figura 75).

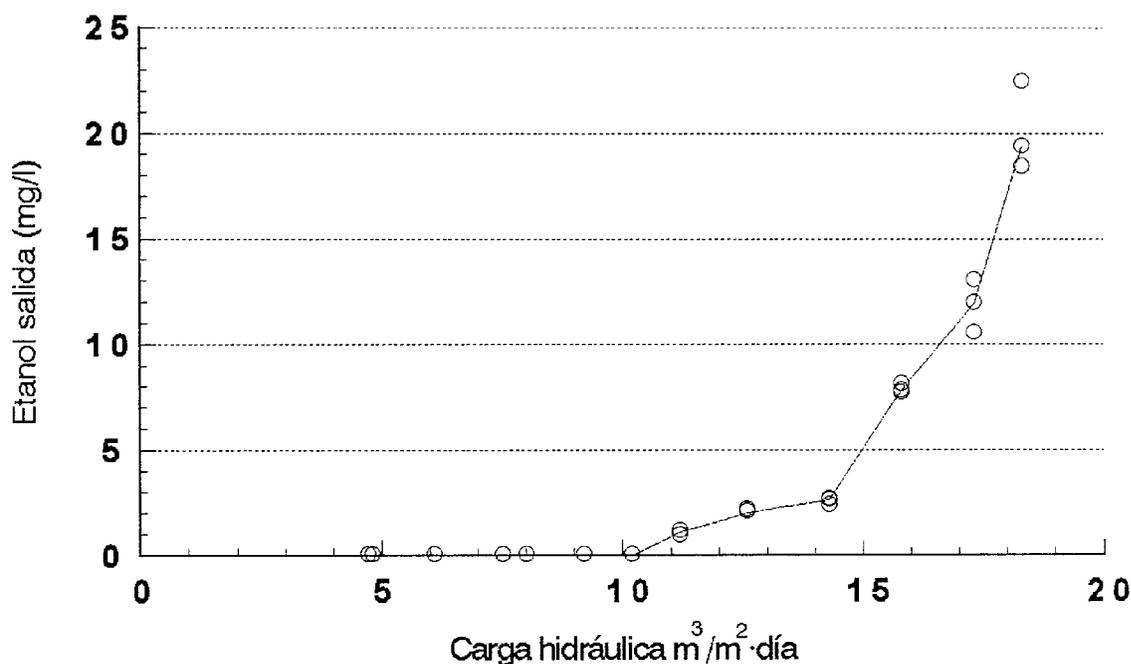


**Figura 74. Concentraciones de nitrato y nitrito en el agua de salida, en función de la carga hidráulica. Ensayo realizado con la dosificación de etanol necesaria para obtener el máximo rendimiento.**

Independientemente de la presencia de etanol en el agua de salida, la demanda de fuente de carbono crecía conforme se precisaba eliminar mayor cantidad de nitrato. Lógicamente al aumentar el caudal, la cantidad de nitrato a eliminar era superior, por lo que para trabajar al máximo rendimiento, se precisaba mayor cantidad de etanol.

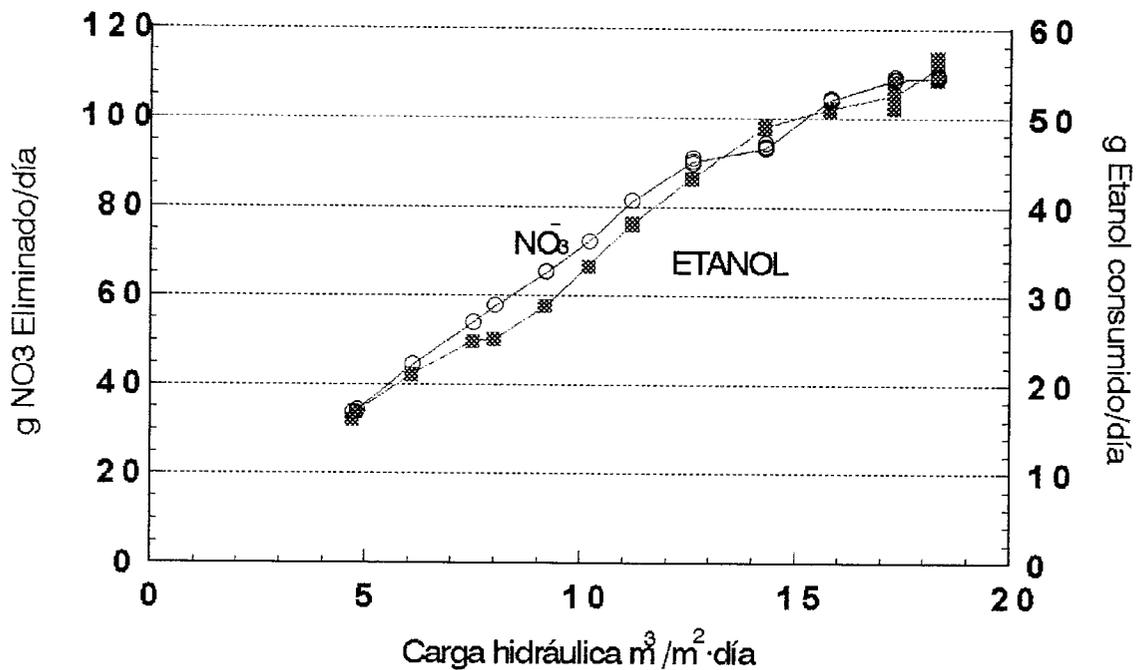
El consumo de etanol crecía paralelamente a la cantidad de nitrato eliminado (figura 76), sin embargo la relación etanol consumido/nitrato eliminado descendía entre las cargas 4.68 y 8.05

$\text{m}^3/\text{m}^2\text{-día}$  desde 0.5 hasta 0.43. Para estas cargas la concentración de etanol precisada en el agua de entrada, necesaria para eliminar el 100% del nitrógeno presente en el agua, descendía desde 51.07 mg/l hasta 44.15 mg/l.



**Figura 75.** Concentraciones de etanol en el agua de salida, para las diferentes cargas hidráulicas ensayadas. Ensayo realizado con adiciones de etanol adecuadas para obtener el máximo rendimiento.

Para mayores cargas hidráulicas se experimentaba un incremento en la relación etanol consumido/nitrato eliminado, hasta un valor de 0.52 para  $14.26 \text{ m}^3/\text{m}^2\text{-día}$ , el máximo alcanzado, de todas las cargas ensayadas. La concentración de etanol necesaria para esta carga fue de 51.17 mg/l y posteriormente esta se incrementó, pero no la relación, debido al aumento de las concentraciones de etanol en el agua de salida.



*Figura 76. Variación del nitrato eliminado y el etanol consumido con el incremento de la carga hidráulica. Ensayo realizado con la adición de etanol adecuada para obtener el máximo rendimiento.*

### 7.2.- ESTUDIO A DIFERENTES ALTURAS DE LA INFLUENCIA DE LA CARGA SUPERFICIAL.

Las cargas hidráulicas ensayadas para el estudio a diferentes alturas fueron 4.68, 8.05, 10.18, 14.26 y 18.33 m<sup>3</sup>/ m<sup>2</sup>·día. Las muestras de agua tomadas se analizaron para su concentración en nitrato, nitrito y etanol. Para cada altura muestreada se determinaron las concentraciones de nitrógeno presentes en el agua, observando que existían diferencias estadísticamente significativas tanto para las diferentes alturas como cargas hidráulicas ensayadas (tabla 37).

**Tabla 37. Análisis de Varianza y test t de Student realizado para las concentraciones de nitrógeno presentes en las diferentes alturas de la columna en función de la carga hidráulica.**

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Cargas	4	131.457	32.8642	18.16	P<0.001
Altura	4	5346.86	1336.72	738.73	P<0.001
Total (corregido)	74	5597.75			

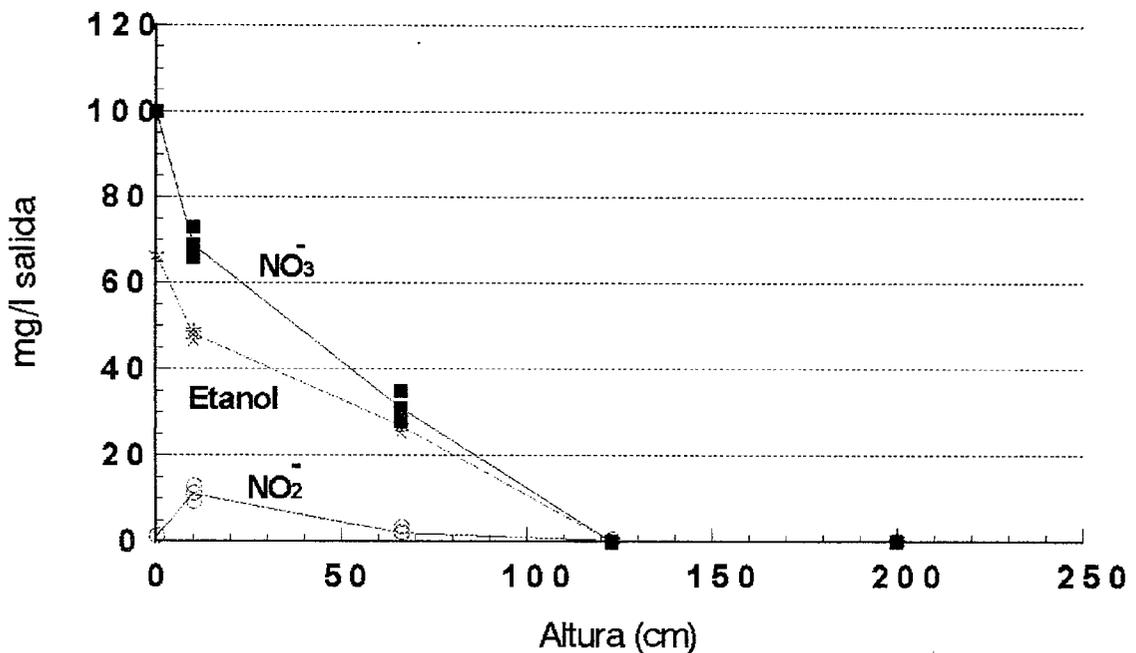
Test t de Student (P<0.05)					
Altura	Media	Grupo	Cargas	Media	Grupo
200	1.1662	a	8.04	9.5273	a
123	2.68633	b	10.18	9.8403	a
66	9.14553	c	4.86	9.87013	a
10	17.9333	d	14.26	11.2393	b
0	22.862	e	18.33	13.0813	c

Al contrario de lo que sucedía con las variaciones de la concentración de nitrato del agua de entrada, para este ensayo no se observaban semejanzas en el comportamiento de cada altura, con respecto a las concentraciones de nitrógeno presentes en ellas. Esto indicaba que existía eliminación de nitrógeno a lo largo de todo el lecho biológico.

Si atendemos al comportamiento de las diferentes cargas hidráulicas ensayadas, se observaba que 4.68, 8.04 y 10.18 m<sup>3</sup>/ m<sup>2</sup>·día tenían un comportamiento semejante, variando este para 11.23 m<sup>3</sup>/ m<sup>2</sup>·día y 18.33 m<sup>3</sup>/ m<sup>2</sup>·día, que a su vez eran diferentes entre si. Las dos últimas cargas presentaban mayores concentraciones medias de nitrógeno, indicativo de que no se eliminaba todo el nitrato presente en el agua de entrada y que para 18.33 m<sup>3</sup>/ m<sup>2</sup>·día, se eliminaba aún en menor cantidad.

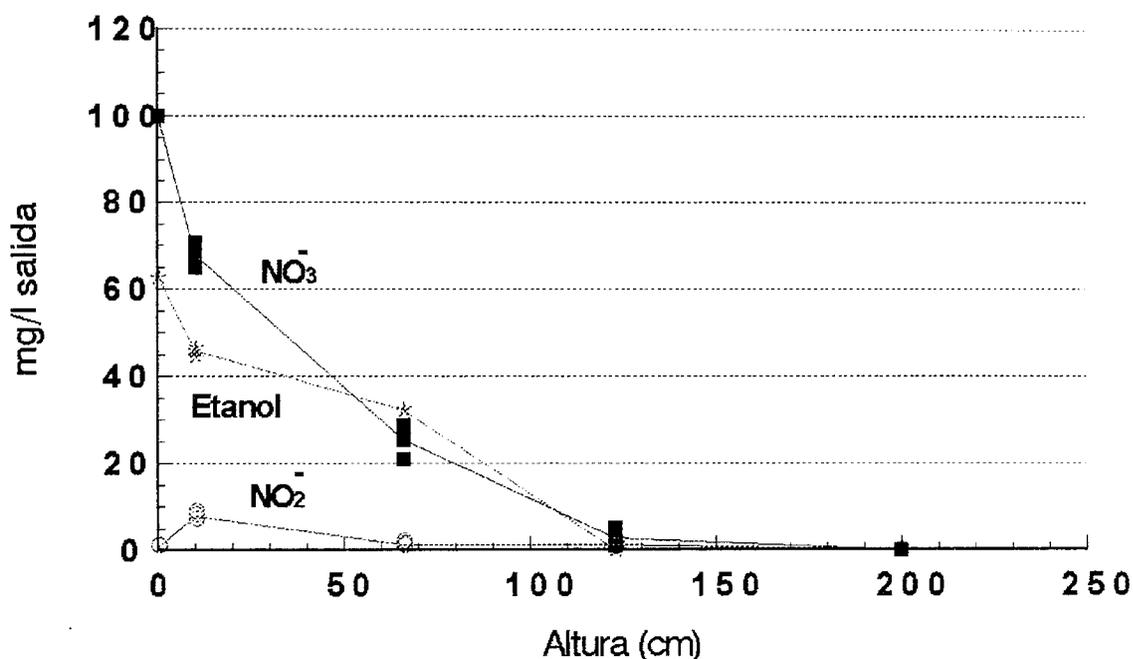
Atendiendo a los valores medios obtenidos para cada altura, se observa como los mayores

descensos se daban entre la entrada y los 10 primeros cm, con un descenso medio de 4.93 mg/l de nitrógeno y entre esta altura y 66 cm con un descenso medio de 8.79 mg/l. Al igual que lo sucedido en los ensayos de carga superficial, los mayores rendimientos del sistema se daban en la parte baja de la columna. Para este caso la zona comprendida entre los 66 cm y 123 cm influían más en la eliminación de nitrato, descendiendo esta considerablemente para los últimos 77 cm.



**Figura 77. Variación de las concentraciones de nitrato, nitrito y etanol, en función de la altura del lecho biológico, para la carga hidráulica 4.68 m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>·día.**

La evolución de las concentraciones de nitrato y nitrito para la carga hidráulica 4.68 m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>·día (figura 77), fue semejante a la demostrada para las cargas 8.05 y 10.18 m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>·día (figuras 78 y 79). En tales ensayos se observaba como había una importante caída de la concentración de nitrato en los 66 primeros cm de columna, desapareciendo posteriormente en la altura 123 cm.



**Figura 78.** Variación de las concentraciones de nitrato, nitrito y etanol, en función de la altura del lecho biológico, para la carga hidráulica  $8.05 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{día}$ .

En la altura 66 cm se había eliminado entre el 60 y el 73% del total del nitrógeno de entrada y ya para la altura 123 cm se había eliminado casi el 100% no siendo necesarios los 77 restantes centímetros del lechos biológico. Donde se observó cierta diferencia fue para las concentraciones de nitrito, las cuales alcanzaban su valor máximo a lo 10 cm para las cargas hidráulicas  $4.68$  y  $8.05 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{día}$ , siendo esta de  $11\pm 1.87 \text{ mg/l}$  y  $7.92\pm 0.76 \text{ mg/l}$  respectivamente. Para la carga hidráulica  $10.18 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{día}$ , la altura donde se registraba la mayor concentración de nitrito se desplazaba hasta la altura 123 cm, alcanzando el valor de  $7.96\pm 0.15 \text{ mg/l}$ .

Para la carga hidráulica  $14.26 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{día}$  (figura 80), se obtenía una eliminación del 75% en la altura 123 cm, no siendo capaz el resto del lecho de eliminar el nitrato presente en el agua, observándose una concentración media de nitrato y nitrito en el agua de salida de  $4.56\pm 0.68 \text{ mg/l}$  y  $2.65\pm 0.05 \text{ mg/l}$  respectivamente. El punto donde se obtenía la mayor concentración de nitrito volvió a desplazarse hacia arriba, alcanzando un valor de  $6.63\pm 0.2 \text{ mg/l}$  en la altura 123 cm.

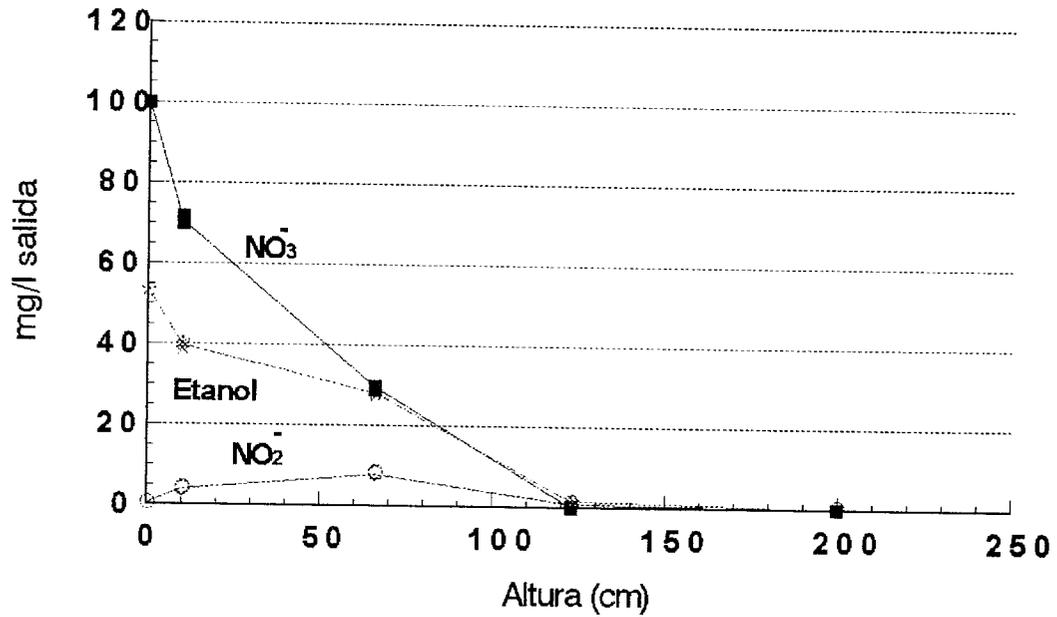


Figura 79. Variación de las concentraciones de nitrato, nitrito y etanol, en función de la altura del lecho biológico, para la carga hidráulica  $10.18 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{día}$ .

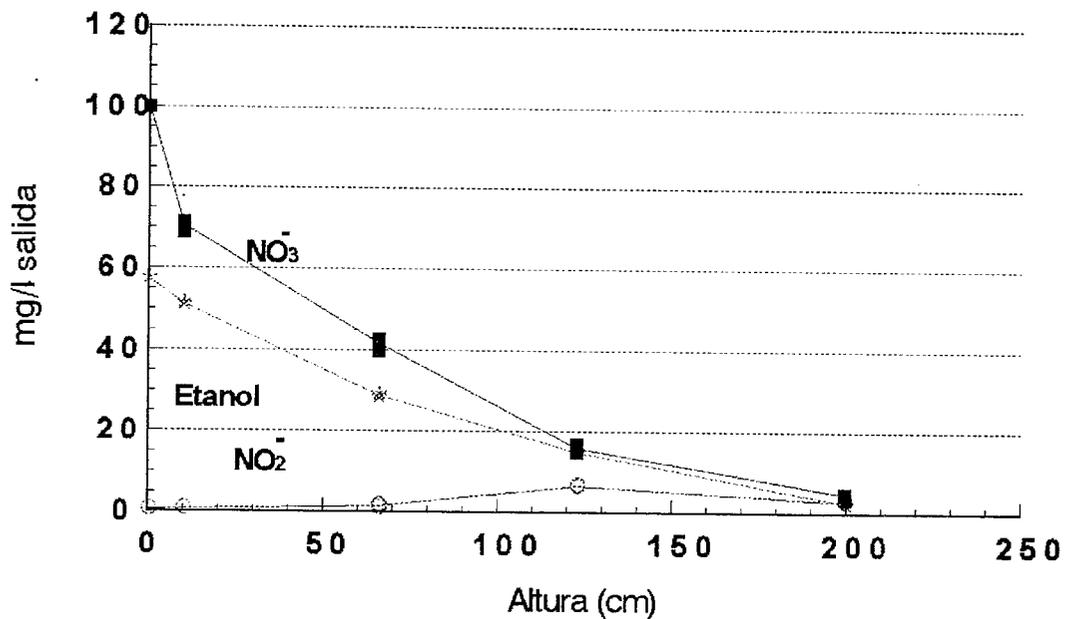
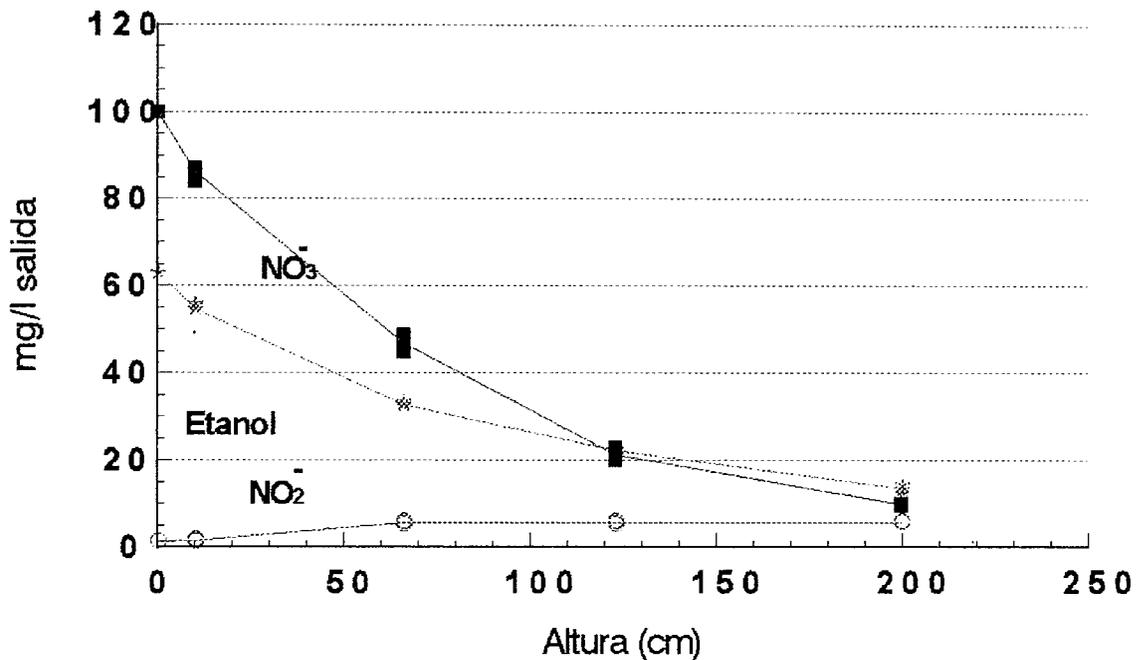


Figura 80. Variación de las concentraciones de nitrato, nitrito y etanol, en función de la altura del lecho biológico, para la carga hidráulica  $14.26 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{día}$ .

Al contrario de lo sucedido para menores cargas hidráulicas, para  $14.26 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{día}$ , se detectaban ciertas concentraciones de etanol en el agua de salida, alcanzando estas un valor de  $2.52\pm 0.17 \text{ mg/l}$



**Figura 81.** Variación de las concentraciones de nitrato, nitrito y etanol, en función de la altura del lecho biológico, para la carga hidráulica  $18.33 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{día}$ .

El rendimiento alcanzado para la carga  $18.33 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{día}$  (figura 81), en la altura 123 cm fue del 71.6% del total del nitrógeno presente en el agua de entrada. Nuevamente los 77 centímetros restantes no eran capaces de eliminar por completo el nitrógeno restante, alcanzando tanto el nitrato y el nitrito una concentración de salida de  $9.83\pm 0.15 \text{ mg/l}$  y  $5.68\pm 0.21 \text{ mg/l}$  respectivamente.

Los máximos valores de nitrito se alcanzaban para la carga  $18.33 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{día}$  a una altura de 66 cm, con una concentración de  $5.58\pm 0.38 \text{ mg/l}$  que se mantenía para el resto de alturas e

incluso en el agua de salida. Nuevamente, la concentración de etanol dosificada en el agua de entrada no se consumía por completo, por lo que se apreciaba en la salida concentraciones de  $13.39 \pm 0.96$  mg/l

### **7.3. VARIACIONES EN EL TAMAÑO DE LA BIOPELÍCULA EN FUNCIÓN DE LA CARGA HIDRÁULICA.**

Los valores de tamaño de biopelícula obtenidos tanto para las diferentes alturas, como para las diferentes cargas hidráulicas ensayadas, presentaban diferencias estadísticas entre si, tal como se muestra en la tabla 38.

**Tabla 38. Análisis de Varianza y test t de Student realizado para los tamaños de biopelícula determinados para las diferentes alturas de la columna y la carga hidráulica ensayada.**

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Cargas	4	278.927	69.7317	112.46	P<0.001
Altura	2	245.882	122.941	198.27	P<0.001
Total (corregido)	44	548.372			

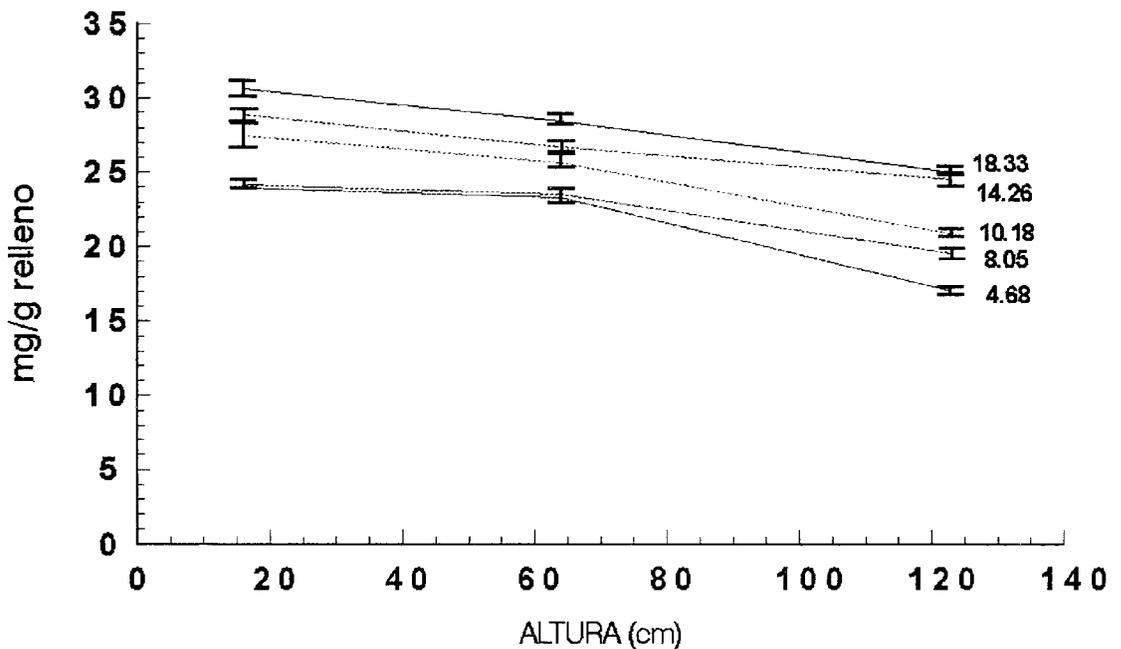
  

Test t de Student (P<0.05)					
Carga	Media	Grupo	Altura	Media	Grupo
4.68	21.4944	a	123	21.5153	a
8.04	22.5033	b	64	25.6133	b
10.18	24.7467	c	16	27.0367	c
14.26	26.7667	d			
18.33	28.1089	e			

El tamaño de la biopelícula variaba en función de la altura, observándose nuevamente los valores más altos en las zonas más bajas del lecho biológico. Estos valores crecían igualmente

conforme se aumentaba la carga hidráulica ensayada.

Las diferencias de tamaño no fueron muy pronunciadas, tal como se aprecia en la figura 82. Así entre la parte baja (10 cm) y la parte alta (123 cm) se apreciaba una diferencia media del 20.4% y entre la carga 4.68 m<sup>3</sup>/ m<sup>2</sup>·día y 18.33 m<sup>3</sup>/ m<sup>2</sup>·día esta era del 23.5%. Las mayores diferencias se observaron por lo general entre la altura 10 cm y 66 cm, aunque para cada carga había comportamientos diferentes en este aspecto.



**Figura 82.** *variación del tamaño de la biopelícula en función de la carga hidráulica ensayada y la altura de muestreo. Las barras representan la desviación estándar.*

Los mayores descensos en el tamaño de la biopelícula se registraban para las cargas 4.68, 8.05 y 10.18 m<sup>3</sup>/ m<sup>2</sup>·día, entre la altura 66 cm y 123 cm, siendo estos del 26.79, 19 y 18.41% respectivamente. En esta zona y para las cargas ensayadas se registraban bajas concentraciones de nutrientes con respecto a las obtenidas en las partes bajas.

Para la carga 14.26 m<sup>3</sup>/ m<sup>2</sup>·día, apenas se apreciaba descenso siendo este del 7% entre los 10 y 66 cm y a casi del 1% entre 66 cm y 123 cm. Ya para este ensayo, las concentraciones de nutrientes en las partes altas de la columna eran superiores.

La carga 18.33 m<sup>3</sup>/ m<sup>2</sup>·día que presentaba los mayores valores de biopelícula para todas las alturas muestreadas, presentaba un descenso semejante al de la carga hidráulica anterior entre las alturas 10 y 66 cm duplicándose este (12.34%) entre las alturas 66 y 123 cm.

#### **7.4.- VARIACIONES EN HETERÓTROFOS CAPACES DE CRECER EN AUSENCIA DE OXÍGENO (HAO), EN FUNCIÓN DE LA CARGA HIDRÁULICA.**

Los recuentos de HAO realizados variaban en función de la altura del lecho biológico y de la carga hidráulica ensayada. Tanto para las alturas como para las diferentes cargas, se obtenían recuentos con diferencias estadísticamente significativas entre ellos, tal como se refleja en la tabla 39.

**Tabla 39** *Análisis de Varianza y test t de Student realizado para los recuentos de HAO, determinados para las diferentes alturas de la columna y la carga hidráulica ensayada.*

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Cargas	4	1.8871e <sup>17</sup>	4.7176e <sup>16</sup>	52.16	P<0.001
Altura	2	1.7266e <sup>17</sup>	8.6334e <sup>16</sup>	95.45	P<0.001
Total (corregido)	44	3.9574e <sup>17</sup>			

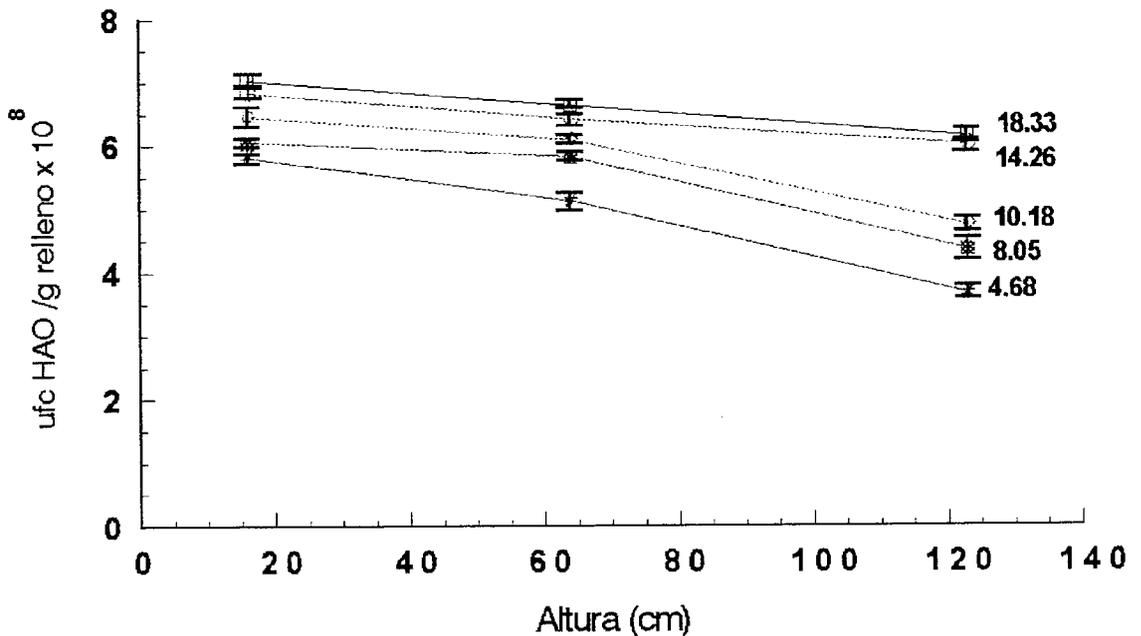
  

Test t de Student (P<0.05)					
Carga	Media	Grupo	Altura	Media	Grupo
4.68	4.884e <sup>8</sup>	a	123	4.972e <sup>8</sup>	a
8.05	5.363e <sup>8</sup>	b	64	6.031e <sup>8</sup>	b
10.18	5.777e <sup>8</sup>	c	16	6.442e <sup>8</sup>	c
14.26	6.432e <sup>8</sup>	d			
18.33	6.617e <sup>8</sup>	d			

Los valores medios de recuentos, obtenidos para cada altura, diferían entre si, siendo algo más parecidas entre la altura 10 y 66 cm y variando en un 17.5% entre las alturas 66 y 123 cm.

En cuanto a los valores obtenidos para las diferentes cargas ensayadas, estos crecían por lo general al aumentar la carga hidráulica variando entre la carga 4.68 m<sup>3</sup>/ m<sup>2</sup>·día y 18.33 m<sup>3</sup>/ m<sup>2</sup>·día un 26%. Hay que destacar que la carga 14.26 y 18.33 m<sup>3</sup>/ m<sup>2</sup>·día no presentaban diferencias entre sus valores.

Tanto la carga 14.26 y 18.33 m<sup>3</sup>/ m<sup>2</sup>·día presentaban las menores variaciones en los recuentos siendo estas del 6% y 5.54% respectivamente entre la altura 10 y 66 cm y 5.91% y 7.1% entre las alturas 66 y 123 cm.



**Figura 83. Variación de los recuentos de HAO en función de la carga hidráulica ensayada y la altura de muestreo. Las barras representan la desviación estándar.**

Para el resto de cargas, los mayores descensos se observaban entre la altura 66 y 123 cm,

siendo estos del 28.4% para las cargas 4.68 y 8.05 m<sup>3</sup>/ m<sup>2</sup>·día y 21.75% para la carga 10.18 m<sup>3</sup>/ m<sup>2</sup>·día. Fue significativo también el descenso para la carga 4.68 m<sup>3</sup>/ m<sup>2</sup>·día entre los 10 y 66 cm, alcanzando este el valor de 11.7%.

**7,5.- VARIACIONES DE BACTERIAS DESNITRIFICANTES, EN FUNCIÓN DE LA CARGA HIDRÁULICA.**

Los recuentos de bacterias desnitrificantes realizados a diferentes alturas y para diferentes cargas hidráulicas ensayadas presentaban diferencias estadísticamente significativas entre ellos, tal como se observa en la tabla 40.

*Tabla 40 Análisis de Varianza y test t de Student realizado para los recuentos de bacterias desnitrificantes, determinados para las diferentes alturas de la columna y la carga hidráulica ensayada.*

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Cargas	4	1.1824e <sup>17</sup>	2.9559e <sup>16</sup>	68.16	P<0.001
Altura	2	2.9334e <sup>17</sup>	1.4667e <sup>17</sup>	338.21	P<0.001
Total (corregido)	44	4.2806e <sup>17</sup>			

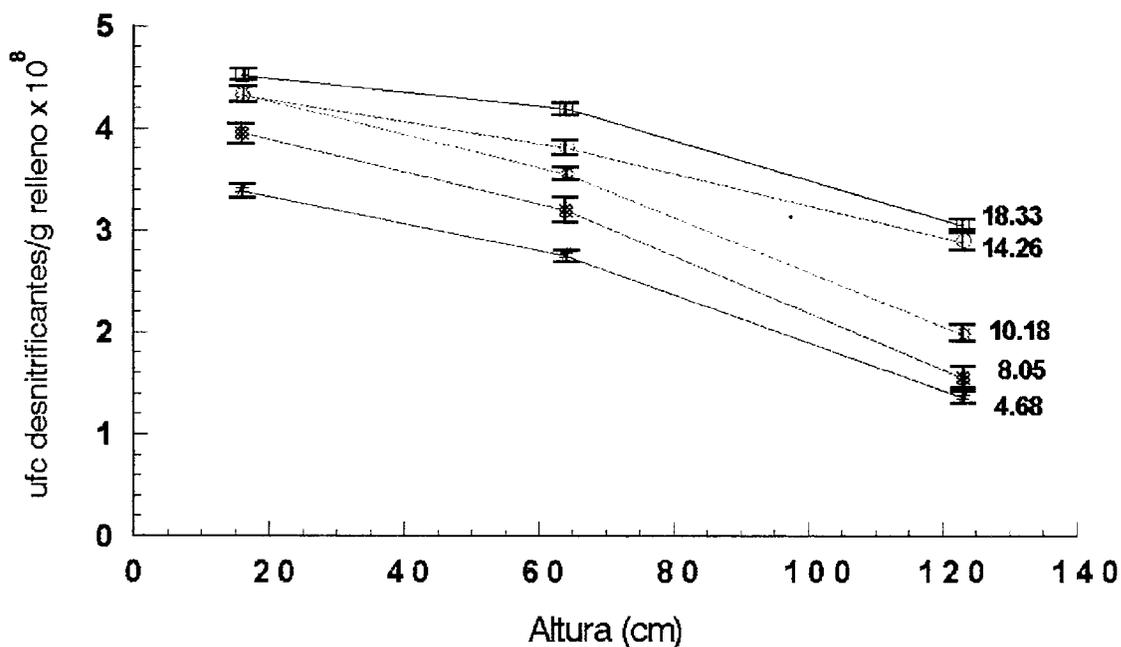
  

Test t de Student (P<0.05)					
Carga	Media	Grupo	Altura	Media	Grupo
4.68	2.505e <sup>8</sup>	a	123	2.181e <sup>8</sup>	a
8.05	2.913e <sup>8</sup>	b	64	3.508e <sup>8</sup>	b
10.18	3.297e <sup>8</sup>	c	16	4.108e <sup>8</sup>	c
14.26	3.682e <sup>8</sup>	d			
18.33	3.932e <sup>8</sup>	e			

Al igual que lo sucedido para los estudios de biopelícula y HAO, había un descenso en los recuentos a mayor altura del lecho biológico, con una diferencia media entre la parte baja (10 cm)

y la parte alta (123 cm) del 47%. Igualmente había un crecimiento en los recuentos conforme se aumentaba la carga hidráulica, obteniendo los máximos valores para la carga  $18.33 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{día}$ , la cual difería un 36.4% de la carga  $4.68 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{día}$ .

El máximo recuento obtenido para las bacterias desnitrificantes fue de  $4.52 \pm 0.68 \cdot 10^8$ , dado para la carga hidráulica  $18.33 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{día}$  y en la parte baja de la columna (10 cm). Este recuento experimentó un descenso del 7.1% para la altura 66 cm y del 27% con respecto de la anterior para una altura de 123 cm. Este recuento, a pesar del descenso, era superior al obtenido para las restantes cargas hidráulicas ensayadas en la misma altura (figura 84).



**Figura 84. Variación de los recuentos de bacterias desnitrificantes en función de la carga hidráulica ensayada y la altura de muestreo. Las barras representan la desviación estándar.**

El comportamiento de los recuentos para la carga  $14.26 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{día}$  fue semejante al de la carga superior, pero sus valores eran inferiores en un 6.4%. Para cargas inferiores los

descensos según las alturas se hacían más pronunciados, siendo estos del 18.87%, 19.19% y 17.78% para las cargas 4.68, 8.05 y 10.18 m<sup>3</sup>/ m<sup>2</sup>-día respectivamente, entre las alturas 10 y 66 cm. Estos descensos se hacían mucho más pronunciados entre las alturas 66 y 123 cm , alcanzando valores de 50%, 51.25% y 44%. Para estas cargas y a estas alturas apenas había nutrientes.

La mayor carga superficial que se obtenía en los ensayos con aumento del caudal de trabajo fue de 1.86 Kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ m<sup>2</sup>-día. Los recuentos de desnitrificantes en este punto para la altura 10 cm fueron un 9.4% inferiores que los obtenidos en los ensayos con incremento de la concentración de nitrato en el agua de entrada, pero los descensos obtenidos para mayores alturas, fueron más grandes, obteniendo para 123 cm un recuento mayor en los ensayos con variación de caudal.

#### **7.6.- VARIACIONES DE BACTERIAS REDUCTORAS DE NITRATO, EN FUNCIÓN DE LA CARGA HIDRÁULICA.**

Para los diferentes recuentos de bacterias reductoras de nitrato realizados tanto a diferentes alturas del lecho biológico, como para diferentes cargas hidráulicas, se observaban diferencias estadísticamente significativas entre ellos, tal como se refleja en la tabla 41.

Los recuentos descendían al igual que sucedió para el resto de comunidades bacterianas ensayadas, para mayores alturas, obteniéndose una diferencia del 40% entre las partes bajas del lecho biológico y las zonas altas.

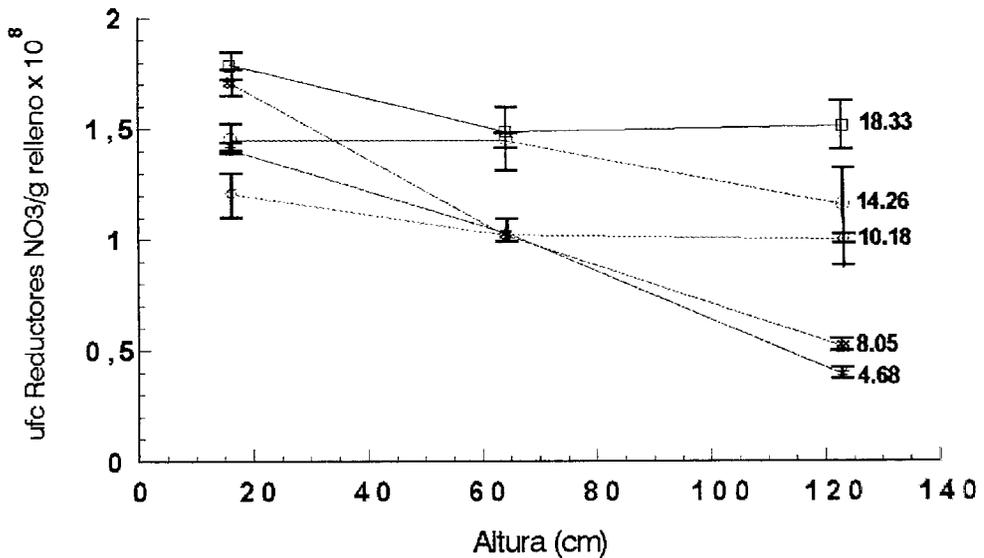
Conforme se aumentaba la carga hidráulica, también se observaba un incremento en los recuentos, pero este crecimiento no fue significativo entre las tres primeras cargas ensayadas, observándose diferencias para 14.26 y 18.33 m<sup>3</sup>/ m<sup>2</sup>-día.

**Tabla 41.- Análisis de Varianza y test t de Student realizado para los recuentos de bacterias reductoras de nitrato, determinados para las diferentes alturas de la columna y la carga hidráulica ensayada.**

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Cargas	4	2.5709e <sup>16</sup>	6.4273e <sup>15</sup>	14.33	P<0.001
Altura	2	2.7371e <sup>16</sup>	1.3685e <sup>16</sup>	30.52	P<0.001
Total (corregido)	44	7.0120e <sup>16</sup>			

Test t de Student (P<0.05)					
Carga	Media	Grupo	Altura	Media	Grupo
4.68	0.935e <sup>8</sup>	a	123	0.914e <sup>8</sup>	a
10.18	1.078e <sup>8</sup>	a	64	1.206e <sup>8</sup>	b
8.05	1.086e <sup>8</sup>	a	16	1.518e <sup>8</sup>	c
14.26	1.356e <sup>8</sup>	b			
18.33	1.605e <sup>8</sup>	c			



**Figura 85. Variación de los recuentos de bacterias reductoras de nitrato en función de la carga hidráulica ensayada y la altura de muestreo. Las barras representan la desviación estándar.**

En la figura 85 se representan las variaciones en los recuentos de bacterias reductoras de nitrato. Los mayores recuentos se obtenían en la altura 10 cm para las cargas hidráulicas 18.33 y 8.05 m<sup>3</sup>/ m<sup>2</sup>·día. Para la primera se producían descensos con la altura más suaves que para la segunda la cual descendía entre los 10 y 123 cm un 70%.

Las cargas hidráulicas 14.26 y 10.18 m<sup>3</sup>/ m<sup>2</sup>·día, no presentaban fuertes variaciones en sus recuentos observándose un descenso del 0.2% y 15.7% respectivamente entre las alturas 10 y 66 cm. Entre los 66 y 123 cm, los descensos fueron del 20% y 1.96%.

## **V.- Discusión.**

## 1.- INFLUENCIA DE LA FUENTE DE CARBONO.

La eliminación biológica de nitrato, mediante desnitrificación, requiere la presencia de una fuente de carbono, la cual por vía catabólica se comporta como un donador de electrones, oxidándose hasta  $\text{CO}_2$ . Los electrones son cedidos mediante la acción enzimática a una cadena de transporte de  $e^-$ , implicándose estos en una serie de reducciones que dan lugar a la producción de energía en forma de ATP. Para el empleo de  $\text{NO}_3^-$ , como aceptor de electrones en la cadena respiratoria de bacterias desnitrificantes, se hace pues precisa, la oxidación de una fuente orgánica de carbono, en bacterias heterótrofas, permitiendo así la obtención de energía para realizar sus funciones metabólicas.

La aplicación de este proceso biológico a la potabilización de aguas subterráneas contaminadas con nitrato, nos obliga a adicionar una fuente de carbono, al no encontrarse esta disponible en este tipo de agua. Ahora bien, si está claro que se debe emplear un donador de electrones, no lo está tanto, cual se debe usar.

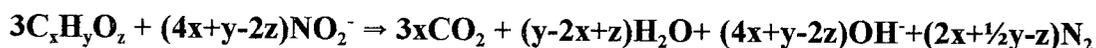
Las bacterias son microorganismos procariotas, reconocidos por su capacidad de adaptación a los factores adversos, incluido la falta de fuente de carbono orgánica. Se han descrito múltiples casos de degradación de xenobióticos por parte de bacterias, los cuales pueden ser empleados como fuente de carbono (Gheewala and Annachhatre, 1997). Esta adaptabilidad es fruto de mutación y selección, que permiten a las bacterias, incluidos los desnitrificantes, emplear las más inverosímiles moléculas (Stainer *et al*, 1988). En esta línea se han descrito casos de desnitrificación empleando moléculas como la anilina (Owen *et al*, 1994), trihalometano (Takasaki *et al*, 1992), fenol o aminas (Nguyen and Shieh, 1995), pero ninguno de los casos destacaba por sus altos valores en actividad desnitrificante. Igualmente se han descrito casos de desnitrificación empleando molécula complejas como fango hidrolizado (Aesøy and Ødegard, 1993) o la celulosa presente en el papel (Vолоkita *et al*, 1996). Para ambos casos se precisaba la acción de otros microorganismos descomponedores, los cuales producían moléculas de menor tamaño. Estas sustancias más sencillas son empleadas por las bacterias desnitrificantes como donadoras de

electrones en los procesos catabólicos. Parece lógico pues, que para conseguir una alta actividad desnitrificante, el donador de electrones deba ser una molécula cuyo empleo suponga el menor gasto energético posible a la célula bacteriana. Este tipo de moléculas serán empleadas principalmente por las bacterias desnitrificantes. En la bibliografía se describen algunas de estas fuentes de carbono fácilmente metabolizables, destacando azúcares como glucosa o sacarosa, alcoholes como etanol o metanol o ácidos como acético o láctico (Akunna *et al*, 1993).

Los principales procesos en los que se han empleado estas fuentes de carbono, con el objeto de eliminar nitrato mediante desnitrificación, son los tratamientos de aguas residuales (Nyberg *et al*, 1992), o tratamientos del medio natural, mediante aplicaciones directas (Christensen, 1992). También se han realizado múltiples estudios "in-vitro" (Egert *et al*, 1993), indicando todos ellos la versatilidad del proceso. Ahora bien, sobre el comportamiento de este proceso y sus aplicaciones a la potabilización de aguas subterráneas, empleando fuentes de carbono fácilmente metabolizables, poco se conoce.

En esta línea se seleccionaron una serie de donadores orgánicos de electrones, para su empleo en filtros sumergidos, teniendo en cuenta no solo su fácil metabolización por bacterias, sino también caracteres como su manejabilidad, facilidad de dosificación, y su coste económico. Las fuentes de carbono seleccionadas fueron sacarosa, metanol y etanol. Todas ellas se habían ensayado con anterioridad, para su aplicación en desnitrificación (Dahab and Lee, 1992; Nurizzo and Mezzanotte, 1992; Janning *et al*, 1995), ofreciendo diferentes ventajas y desventajas.

Drtil *et al* (1995) describían una relación estequiométrica para las reacciones desasimilatorias de nitrato y nitrito empleando un donador orgánico de electrones, basándose en el modelo cinético dado por Randall *et al* (1992).



Si aplicamos esta relación estequiométrica para la sacarosa ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ), considerando el consiguiente aporte de  $H^+$ , dado en una cadena de transporte de electrones, la relación quedaría como:



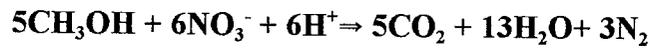
De esta relación estequiométrica se desprende que para la eliminación total del nitrato se precisa una relación de 0.57 unidades de sacarosa por unidad de nitrato a eliminar. Los valores reales obtenidos en la planta piloto, difieren de los teóricos, siendo los primeros superiores. Para la eliminación de una unidad de nitrato se precisaban 1.33 unidades de sacarosa. Esto suponía un empleo de la sacarosa, no solo para los procesos desasimilatorios de desnitrificación, sino también para otros procesos metabólicos desarrollados en la biopelícula.

Para las condiciones de trabajo (100 mg/l de  $NO_3^-$  en el agua de entrada, caudal de trabajo de 27 l/h, 0 mg/l de  $O_2$  disuelto en el agua a tratar y volumen de reactor de 0.141 m<sup>3</sup>), el incremento en la dosificación de sacarosa aumentaba las concentraciones de nitrato eliminado del agua contaminada, ajustándose el proceso a una regresión lineal. Debido a que la ordenada en el origen, obtenida en los ajustes, era superior a 0, conforme se aumentaba la dosificación de fuente de carbono, la relación sacarosa adicionada/nitrato eliminado aumentaba, debido a la eliminación inicial sin previa dosificación de sacarosa.

La formación de la biopelícula se realizó mediante la recirculación de licor mezcla de un reactor de fangos activados. En este inóculo había gran cantidad de materia orgánica que podría actuar como donadora de electrones en la eliminación previa de nitrato. Esto sería motivo por el cual la relación sacarosa/nitrato debía estar por debajo del valor estequiométrico, sin embargo este fue casi el doble, implicando un consumo de sacarosa en otros procesos metabólicos desarrollados por microorganismos.

Chen y Lin (1993) describían igualmente la relación estequiométrica existente en los

procesos de desnitrificación empleando metanol como fuente de carbono:



De la relación estequiométrica se desprende que la relación metanol adicionado/nitrato eliminado, para una eliminación total del nitrato presente en el medio, vía desnitrificación, es de 0.43. Igualmente este valor era inferior al obtenido en la planta piloto, el cual era de 0.63. Esta relación se mantenía a lo largo de todo el ajuste lineal, ya que este partía desde una ordenada en el origen de valor 0. Esto no implicaba que en ausencia de metanol no se consumiese nitrato por parte del sistema, ya que esto si se producía. El ajuste lineal partía de 0, debido a que la cantidad a adicionar de metanol para igualar el rendimiento, a la fase sin adición de fuente de carbono, era superior al precisado por las otras fuentes de carbono.

Lógicamente las bacterias que forman la biopelícula, son las contenidas en el licor mezcla del reactor de fangos activados. Estas bacterias emplean como fuentes de carbono compuestos procedentes de la hidrólisis de los compuestos orgánicos del agua residual, por lo que precisan un período de adaptación para emplear la fuente de carbono dosificada en la planta piloto (Kang *et al*, 1992). Esta adaptación puede deberse bien a cambios enzimáticos en la flora bacteriana que forma inicialmente la biopelícula o bien a un enriquecimiento selectivo en los microorganismos que la componen, que si bien estaban presentes en el licor mezcla, era en muy bajo número (Akunna *et al*, 1993). Hallin *et al* (1996), observaron que la fase de adaptación a la nueva fuente de carbono, no era igual en todos los casos, indicando que esta era más lenta en los ensayos realizados con metanol. Esta parecía ser la causa de la necesidad de mayor dosificación para obtener los mismos rendimientos que sin adición externa de fuente de carbono, ya que la dosificación de metanol, para conseguir el rendimiento obtenido sin su adición, fue de 27 mg/l, mientras que para la sacarosa y el etanol era de 19.7 mg/l y 11.5 mg/l respectivamente.

Para el proceso de desnitrificación con etanol, Constantin y Fick (1997) describían como relación estequiométrica la siguiente:



La relación para la ecuación estequiométrica es de 0.309 unidades de etanol por cada unidad de nitrato eliminado, cuando esta es completa. Tampoco en este caso la relación fue semejante, volviendo esta a ser superior (0.46). El comportamiento del sistema fue parecido a la sacarosa, en cuanto a la adaptación inicial, dando una ordenada en el origen cercana.

De los ajustes lineales se desprende que los rendimientos del sistema fueron mejores para el etanol, que para el metanol y los de este, mejores que los de la sacarosa, a pesar de su mayor período de adaptación. Este orden fue idéntico al que se desprendía de las relaciones estequiométricas, quedando claro que en los tres casos la fuente de carbono era empleada en la biopelícula para otros procesos metabólicos, además de la desnitrificación.

Para la eliminación total de los 100 mg/l de nitrato, presentes en el agua contaminada, los consumos diarios de fuente de carbono obedecían a las relaciones obtenidas, siendo estos de 37 ml para el etanol, 49.8 ml para el metanol y 86.0 g para la sacarosa. Estas cantidades eran inferiores si solo se pretendía ajustar la concentración de nitrato al máximo admisible marcado por la legislación (B.O.E. 1138/1990). Así si se pretendía eliminar una concentración de 60 mg/l de nitrato para cumplir con la legislación y dar un margen de seguridad, las cantidades diarias empleadas eran de 20 ml de etanol, 31 ml de metanol y 42 g de sacarosa. Para este caso seguía el etanol dando mejores rendimientos y la sacarosa los peores.

Para las tres fuentes de carbono ensayadas se obtenía una alta correlación (con signo negativo) entre la concentración de nitrato en el agua de salida y la relación C/N. No sucedía lo mismo con las concentraciones de nitrito, las cuales aumentaban al principio conforme se incrementaba la dosificación de fuente de carbono, para posteriormente desaparecer, en los puntos donde se eliminaba completamente el nitrógeno del agua contaminada.

El proceso de reducción de nitrato a nitrito, realizado por la enzima nitrato reductasa,

puede seguir tanto por vía asimilatoria, empleándose como fuente de nitrógeno, o bien por vía desasimilatoria, comportándose como un aceptor de electrones (Mc Nall and Atkinson, 1956; Mac Nall and Atkinson 1957). Los dos procesos pueden ser realizados por bacterias desnitrificantes de modo simultaneo y el primero es realizado por la mayoría de las bacterias, las cuales pueden estar presentes en la biopelícula (reductores de nitrato). La posibilidad de darse estos dos procesos, puede ser causa de la presencia de nitrito en el agua tratada, en función de la concentración de fuente de carbono adicionada. Constantin y Fick (1997) estudiaron la aplicabilidad de los procesos biológicos de desnitrificación para depurar aguas residuales industriales con alto contenido en nitrato, empleando una concentración en exceso de fuente de carbono. Estos autores indicaban que solo en la fase de iniciación del proceso se obtenían nitritos. Lógicamente si predomina la desnitrificación, para lo cual se precisa una adecuada cantidad de donador de electrones, el nitrito se reduce por completo, vía desasimilatoria, al igual que el nitrato. Si esta concentración de fuente de carbono no es suficiente o la flora bacteriana no está adaptada a su empleo, el nitrito se produce por vía asimilatoria y aparece en el agua de salida. Betlach y Tiedje (1981), indicaban que las acumulaciones de nitrito en un medio de cultivo donde crecían bacterias desnitrificantes, se debía a una insuficiente concentración de fuente de carbono, este efecto podía ser el responsable de las acumulaciones de nitrito en la planta piloto.

Si atendemos a los valores obtenidos en función de la relación C/N, observamos que para los tres procesos ensayados, había un incremento inicial, cuando se empleaban pequeñas concentraciones de fuente de carbono, en las concentraciones de nitrito. Posteriormente las concentraciones descendían para mayores relaciones C/N, al igual que sucedía con el nitrato. Esto indicaba un mayor predominio de los procesos de desnitrificación para altas concentraciones de fuente de carbono, en las cuales tanto en nitrato como el nitrito pueden comportarse como aceptores de electrones.

La concentración de nitrito, aunque tenía una tendencia parecida para las tres fuentes de carbono ensayadas, variaba en función de esta, siendo mayores para la sacarosa. Esto indicaba una influencia de la fuente de carbono en la acumulación de nitrito, proceso que ya fue descrito con

anterioridad por otros autores (Paul *et al*, 1989). En función del donador de electrones empleado, podría haber un diferente comportamiento metabólico de la biopelícula, así para el metanol y etanol predominaba la actividad desnitrificante, permitiendo una menor acumulación de nitrito, para bajas dosis de fuente de carbono, mientras que para la sacarosa predominaban los procesos asimilatorios.

Otros fenómenos que afectan a la posible acumulación de nitrito son el efecto inhibitorio que altas concentraciones de nitrato pueden ejercer sobre la nitrito reductasa (Betlach And Tiedje, 1981), no siendo este el caso, ya que la concentración de nitrato era constante y la acumulación obedecía más a una variación en la fuente de carbono. Por otro lado se ha descrito que según el tipo de bacterias desnitrificantes que componen la biopelícula, se puede observar una diferente acumulación de nitrito (Lazarova *et al*, 1992). Atendiendo a esto, se puede pensar que la fuente de carbono pueda ser causante de una selección de determinados microorganismos, responsables de la acumulación de nitrito. Esto se verá con más profundidad en los estudios microbiológicos.

La concentración máxima admisible de nitrito en el agua de consumo público, está estimada en 0.1 mg/l (B.O.E.1138/1990), por lo que a excepción de las fases del tratamiento donde se lograba una completa eliminación de nitrógeno, en el resto se precisaba un posterior tratamiento que eliminara el nitrito. Este anión es muy inestable, obedeciendo su presencia en el agua principalmente a reducciones bacterianas sobre el nitrato. Por simples oxidaciones como las que pueden producir las concentraciones de oxígeno disuelto en el agua el nitrito se puede transformar en nitrato. Así, mediante una simple oxigenación del agua, producida por agitación, se pueden eliminar pequeñas concentraciones de nitrito. Ahora bien si estas concentraciones son más altas y persistentes como sucedía en los ensayos con sacarosa, no bastaría con la agitación, obligándonos a adicionar oxidantes semejantes a los empleados en los procesos de desinfección del agua.

Hay que destacar que en las fases de máximo rendimiento en la eliminación de nitrógeno, para las tres fuentes de carbono, se observaba un incremento de la concentración de estas en el

agua de salida. Las concentraciones más altas se daban para la sacarosa y las menores para el etanol, pero los mayores problemas los presentaba el metanol. Las concentraciones de esta fuente de carbono, en el agua de salida, se mantenían en torno a 1 mg/l, independientemente de la dosificación de fuente de carbono. Para dosificaciones cercanas al 100% en eliminación de nitrógeno, esta concentración aumentaba hasta 4 mg/l, lo cual nos obligaba a su eliminación por los efectos tóxicos que sobre la salud humana crea el consumo de metanol. El empleo de esta fuente de carbono, nos obliga a posteriores tratamientos del agua como el empleo de un filtro de carbon activo para eliminarlo.

## **2.- INFLUENCIA DEL OXÍGENO DISUELTO EN EL AGUA A TRATAR.**

Además de la concentración y tipo de fuente de carbono, sobre la desnitrificación pueden influir otros factores externos como la temperatura (Pfenning and MacMahon, 1996), el pH (Beaubien *et al*, 1995) y sobre todo la concentración de oxígeno (Körner and Zumft, 1989).

Como para todo proceso biológico, la desnitrificación tiene una temperatura óptima para realizarse, valores inferiores a esta temperatura implican un descenso en la actividad del proceso y por lo tanto un descenso en los rendimientos del sistema (Bernet *et al*, 1995). La temperatura en nuestros ensayos vendrá dada por la que tenga el agua a tratar, la cual dependerá a su vez de la temperatura ambiente. Es por ello, por lo que estos sistemas deben ubicarse en sitios cerrados, evitando así que las fluctuaciones de temperatura afecten al proceso y supongan un descenso en la capacidad de eliminar nitrato. No obstante el alto calor específico que tiene el agua, le hace jugar un papel termoregulador (Hernández-Muñoz, 1990), de modo que las variaciones de temperatura entre el día y la noche son bajas.

Como margen de seguridad la planta piloto se ubicó bajo una estructura metálica, resguardándola del exterior. Por otro lado se trabajó siempre en meses en los que los valores de temperatura del agua estaban entre 15 y 20°C, evitando siempre trabajar a menores temperaturas.

Los valores óptimos de pH para la desnitrificación están próximos a la neutralidad, con cierta tendencia a valores levemente alcalinos (Thomas *et al*, 1994). El agua subterránea empleada en la investigación manifestaba un pH constante en torno a 7.5. Este valor podía variar por los procesos microbiológicos desarrollados en la biopelícula, afectando a los procesos de desnitrificación. Sin embargo las determinaciones que se realizaron indicaban un ligero aumento a valores de 7.7 o 7.8, por lo que la biopelícula ejercía un cierto efecto regulador que evitaba las fluctuaciones en el pH. Debido a esto se podía pensar que el pH no afectaba al proceso desarrollado en el filtro biológico.

El factor externo que sí podía alterar los rendimientos del filtro sumergido era el oxígeno disuelto en el agua a tratar. La agitación dada al agua subterránea al captarla mediante bombeo hacía que se incrementase el oxígeno disuelto en esta hasta un valor de 4.5 mg/l. Dicha concentración podía tener un efecto negativo, ya que todas las bacterias desnitrificantes aisladas en este sistema (bacilos gram-negativos) eran aerobias (Anon. 1984). Estas bacterias en presencia de oxígeno, emplean este como último aceptor de electrones, antes que el nitrato, ya que obtienen mayores valores de energía (Thauer, 1977). Por otro lado hay que indicar que el oxígeno ejerce un efecto inhibitorio sobre la desnitrificación, tanto a nivel enzimático como a nivel genético (Braun and Zumft, 1992).

Debido a este efecto inhibitorio, ya en las adaptaciones de las estaciones depuradoras, para la eliminación de nitrógeno mediante un proceso de nitrificación-desnitrificación, se empleaban dos diferentes reactores, uno aireado donde se nitrificaba y otro anóxico donde se potenciaba la desnitrificación (Zhao *et al*, 1994). Posteriormente y con la idea de descender espacio se comenzaron a aplicar los sistemas de biopelícula para la eliminación de nitrógeno mediante los mismos procesos biológicos (Çeçen and Gönenç, 1992; Meaney and Strickland, 1993). Estos sistemas permitían mantener una mayor densidad bacteriana por unidad de volumen, así como una mayor actividad biológica (Lemmer *et al*, 1994). Por otro lado había que destacar que ofrecían como desventaja el mayor flujo de oxígeno que se precisaba en la fase de nitrificación, ya que debía difundir hacia el interior de la biopelícula. Sin embargo esta dificultad de difundir el oxígeno

hacia el interior de la biopelícula es una ventaja para la fase de desnitrificación, la cual se puede ver menos influenciada por las concentraciones de oxígeno que quedan en el efluente tras su paso por el reactor aireado. Estas concentraciones descendían considerablemente la desnitrificación en sistemas de lecho fluido, donde la agitación facilitaba la llegada de oxígeno a toda la masa bacteriana depuradora (Fernández-Polanco *et al*, 1993).

Para nuestra investigación, en los ensayos realizados, con 4.5 mg/l de oxígeno disuelto en el agua a tratar, se lograba también eliminar por completo los 100 mg/l de nitrato del agua contaminada, con las tres fuentes de carbono ensayadas. Ahora bien, las pendientes de las rectas obtenidas eran inferiores a las del proceso sin oxígeno, lo cual indicaba que se precisaba una mayor dosificación de fuente de carbono para mantener el rendimiento del sistema. Rahmani *et al* (1995) apreciaban un comportamiento semejante, indicando que el oxígeno era consumido en las zonas iniciales de la columna. Posteriormente al desaparecer este, se consumía el nitrato.

Las dosificaciones diarias fueron de 103.3 g/día para la sacarosa, 58 ml/día para el metanol y 41.7 ml/día para el etanol. Esto suponía un incremento del 34%, 14% y 11.2% respectivamente para las dosificaciones de fuente de carbono, viéndose la sacarosa más afectada que los alcoholes, por la presencia de oxígeno disuelto en el agua. Lógicamente estos incrementos en la concentración de fuente de carbono obedecían al consumo de esta, producido cuando se empleaba el oxígeno como aceptor de electrones.

Zhang y Bishop (1994), destacaban que la estructura y actividad de una biopelícula no era homogénea, debiéndose esto en parte a la diferente difusión de nutrientes a través de ella. En la zona externa la actividad metabólica es más alta y a ella acceden más fácilmente los componentes del agua que contacta con la biopelícula. La zona interna es más inaccesible a estos componentes, principalmente el oxígeno, formándose así una zona aerobia externa y otra anaerobia interna (Hagedorn-Olsen *et al*, 1993). En la zona externa se consumía el oxígeno con la consiguiente cantidad de fuente de carbono, el nitrato difundiría al interior al no emplearse en las capas externas y se eliminaría vía desnitrificación. Atendiendo a esto, en la biopelícula se mantendría una

actividad desnitrificante y se precisaría una mayor dosificación de fuente de carbono para paliar el consumo en los procesos donde el oxígeno era el aceptor.

Nurizzo y Mezzanotte (1992), siguiendo los trabajos de McCarty *et al* (1969), describían una ecuación mediante la cual se calculaba la dosificación necesaria de sacarosa para eliminar nitrato de aguas contaminadas, empleando un sistema de biopelícula.

$$S = 4.19 \cdot (\text{NO}_3^- - \text{N})_R + 0.89 \cdot \text{OD}$$

En la ecuación no solo se tenía en cuenta la cantidad de nitrato a eliminar, sino también la concentración de oxígeno disuelto en el agua a tratar, la cual suponía un gasto adicional de sacarosa. El valor que se deducía de esta ecuación para las condiciones de trabajo establecidas en nuestros ensayos fue muy inferior tanto en el caso de aparecer en el agua 4.5 mg/l de oxígeno disuelto (63.9 g/día de sacarosa), como en ausencia de este (61.3 g/día). Por otro lado el incremento del consumo diario de sacarosa, cuando había oxígeno, solo suponía un 4%, valor muy bajo con respecto a los obtenidos en nuestros ensayos. Estas cantidades podrían ser indicativas de un mayor consumo de fuente de carbono en nuestros ensayos, para otros procesos metabólicos, los cuales se incrementaban para la sacarosa, cuando el oxígeno estaba presente en el agua contaminada.

Al igual que en los ensayos sin oxígeno, cuando se pretendía eliminar solo la cantidad de nitrógeno que ajustase, con un margen de seguridad, las concentraciones de nitrato en el agua a las exigidas por la legislación, la cantidad de sacarosa a adicionar descendía a 50.32 g/día. Esta cantidad seguía siendo inferior a la obtenida en nuestros ensayos, a pesar del consumo inicial de nitrato sin adición previa de sacarosa.

Una ecuación semejante fue establecida para el uso de etanol como fuente de carbono en procesos de eliminación de nitrato, mediante sistemas de biopelícula (Philipot, 1982)

$$E = 1.96 \cdot (\text{NO}_3 - \text{N})_R + 0.55 \cdot \text{OD}$$

Nuevamente se preveía un consumo de etanol en función de la cantidad de nitrato eliminado y por la cantidad de oxígeno presente en el agua. Los valores de etanol por unidad de nitrato eliminado eran inferiores a los estimados para la sacarosa. Lógicamente el empleo de etanol le repercute a la bacteria un balance energético más positivo (Ghose and Bhadra, 1985) que si emplea sacarosa, cuya metabolización supone un gasto energético adicional.

La cantidad de etanol precisada para eliminar todo el nitrato del agua, en las condiciones de trabajo establecidas en nuestra investigación, según se deducía de la fórmula, eran de 37.43 ml/día, un 10% menos del gasto real obtenido en nuestra planta piloto. En este caso se asemejaba más al valor teórico que en el caso de la sacarosa, consumiéndose igualmente cierta cantidad en procesos presumiblemente anabólicos. Para los ensayos sin oxígeno el valor obtenido de la fórmula era un 4.2% inferior al valor obtenido en nuestra planta piloto, existiendo tan solo una diferencia del 5.3% entre el valor teórico con 4.5 mg/l de oxígeno disuelto y sin el. Atendiendo a esto el consumo de etanol estimado teóricamente, cuando se emplea oxígeno como último aceptor de electrones también era inferior al real, debido posiblemente a un incremento en la actividad anabólica de la biopelícula, en presencia de oxígeno.

Cuando la cantidad de nitrato a eliminar era inferior, como sucedía cuando se descendía el nitrato a concentraciones permitida por la legislación, la cantidad teórica y la real se asemejaban. En este caso los consumos de etanol tenían un comportamiento semejante a los deducidos en otras investigaciones, lo cual no sucedía con la sacarosa.

Si comparamos las relaciones fuente de carbono/nitrato eliminado, obtenidas de las reacciones estequiométricas y las de las fórmula teóricas, tanto para la sacarosa como para el etanol se apreciaba una menor necesidad de fuente de carbono para eliminar el nitrato vía desnitrificación, que la obtenida por las fórmulas. Esto indicaba que había un consumo de fuente de carbono adicional al precisado para la desnitrificación. En nuestros ensayos existían mayores

consumos de fuente de carbono que los deducidos de las fórmulas teóricas, sobre todo en presencia de oxígeno y cuando se empleaba sacarosa. En estos casos se potenciaba el consumo de fuente de carbono para otros procesos metabólicos, diferentes de los catabólicos.

Lógicamente, para el metanol se observaban incrementos en su consumo cuando en el agua había 4.5 mg/l de oxígeno disuelto. Estos incrementos eran semejantes a los experimentados por el etanol, siendo, como en los ensayos sin oxígeno, algo superior el consumo de metanol por unidad de nitrato eliminada, que para el etanol. Igualmente en el agua de salida seguían registrándose concentraciones de metanol que limitaban el uso por su toxicidad.

La presencia de oxígeno en el agua a tratar, no solo implicaba un mayor consumo de fuente de carbono, para lograr iguales rendimientos. Como se indicó anteriormente, el oxígeno actúa inhibiendo algunos de los pasos enzimáticos de la desnitrificación, entre ellos la actividad de la óxido nítrico reductasa, lo cual puede ser causa de un incremento en la producción de  $N_2O$ , un gas que afecta negativamente a la atmósfera al influir negativamente sobre la capa de ozono (Cofman-Anderson and Levine, 1986). Otro punto donde actúa el oxígeno es limitando la producción de la nitrito reductasa, inhibiendo la interpretación genética que codifica la enzima (Korner and Zumft, 1989). Esto podría tener como consecuencia la acumulación de nitrito en el medio donde se realiza la desnitrificación.

Si atendemos a las concentraciones de nitrito en el agua de salida, estas seguían un comportamiento semejante al presentado en los ensayos sin oxígeno, dependiendo sus valores de la concentración de fuente de carbono adicionada. En cuanto a las concentraciones obtenidas, estas no presentaban variaciones significativas para el metanol y el etanol, pero si se apreciaba un importante incremento para la sacarosa, llegando a alcanzar valores de salida de 28 mg/l.

Si atendemos a los ensayos realizados con incremento de oxígeno, vemos que existía una relación directa entre el incremento de la concentración de oxígeno y el descenso del rendimiento del sistema. Lógicamente a más oxígeno, más fuente de carbono se consume para obtener energía

por esta vía y menos cantidad de nitrógeno se elimina mediante desnitrificación. Esto fue mucho más acusado para la sacarosa, cuyo ajuste lineal, entre concentración de oxígeno y nitrógeno eliminado, manifestaba el mayor valor de pendiente negativa. Tanto el metanol como el etanol tenían una pendiente semejante, por lo que su comportamiento frente al incremento de oxígeno era parecido.

Como era de esperar las concentraciones de nitrato en el agua de salida, para una misma dosificación de fuente de carbono, se incrementaban conforme aumentaba la cantidad de oxígeno disuelto, sucediendo igual con el nitrito. Nuevamente los incrementos experimentados cuando se empleaba etanol y metanol fueron muy inferiores con respecto a los observados para la sacarosa. La causa de esta mayor acumulación de nitrito podría deberse a la composición bacteriana de la biopelícula, ya que el efecto inhibitor del oxígeno sobre la nitrito reductasa puede ser diferente según la especie bacteriana (Thomas *et al*, 1994). Por otro lado había que tener en cuenta el diferente comportamiento de la biopelícula con y sin oxígeno en el agua a tratar, así como la relación existente entre reductores de nitrato y desnitrificantes, para cada relación C/N ensayada.

Al igual que lo sucedido en los ensayos sin oxígeno, el etanol se presentaba como la fuente de carbono más idónea para la eliminación biológica de nitrato del agua. Los consumos de esta fuente de carbono para iguales rendimientos seguían siendo inferiores a los presentados por las otras fuentes de carbono y se influenciaba menos por los incrementos de oxígeno. Para altas concentraciones de este, se observaba un descenso en los rendimientos y un aumento de la concentración de nitrito en la salida, con valores que no superaban los 2 mg/l, inferiores a los obtenidos para otras fuentes de carbono.

Nuevamente se observaban incrementos en las concentraciones de la fuente de carbono en el agua de salida, siendo estas semejantes a la observadas en los procesos sin oxígeno. Estos valores volvían a ser significativos en los puntos donde se obtenía un 100% de rendimiento, no apreciándose en el caso del etanol, para valores inferiores a la relación C/N 0.6. Para esta relación

se lograba descender los 100 mg/l de nitrato del agua de entrada a valores permitidos por la legislación, sin un significativo incremento de la concentración de nitrito en presencia de 4.5 mg/l de oxígeno.

### **3.- VARIACIONES EN EL TAMAÑO Y COMPOSICIÓN DE LA BIOPELÍCULA.**

El principal responsable de la eliminación de nitrato del agua, en el sistema estudiado, es la biopelícula. Es por ello que los diferentes resultados obtenidos, en el funcionamiento del sistema, debidos a la fuente de carbono empleada, su concentración o el oxígeno disuelto en el agua a tratar, se deban a variaciones sufridas en la biopelícula en función de las características de funcionamiento del sistema. Lógicamente, si se pretende optimizar su funcionamiento, se debe conocer con profundidad el comportamiento de la biopelícula, haciendo hincapié en cuales son sus características y que posibilidades de mejora tendrían.

En estos ensayos se estudió, además del tamaño de la biopelícula, la cantidad de bacterias heterótrofas capaces de crecer sin oxígeno, las cuales, por las condiciones de trabajo, son mayoritarias en la composición de la biopelícula (Ohashis *et al*, 1995). Dentro de este grupo se estudió la cantidad de bacterias desnitrificantes, principales responsables de las transformaciones que se desean, y los reductores de nitrato por su posible influencia en la formación de nitrito.

Tras la recirculación del licor mezcla del reactor de fangos activados y la limpieza realizada en la planta piloto se lograba formar una biopelícula que, con alguna variaciones, tenía un valor de peso seco de 13 mg/g relleno,  $2.66 \cdot 10^8$  ufc /g relleno de heterótrofos capaces de crecer sin oxígeno y una composición variada de bacterias desnitrificantes y reductoras de nitrato, en función de la época de formación de esta. Al hacer pasar el agua contaminada con nitrato y dosificar fuente de carbono, estas características variaban.

Las biopelículas son adaptaciones bacterianas a las condiciones del medio (Caldwell and

Costerton, 1996), mediante las cuales pueden captar mayor número de nutrientes y multiplicarse más fácilmente (Ganczarczyk, 1996). Estas biopelículas presentan una alta variabilidad en cuanto a su composición en microorganismos, proliferando aquellos para los que las condiciones son favorables y tendiendo a desaparecer los que no tienen dichas condiciones (Anaki and Harada, 1993). Lógicamente en nuestro sistema y atendiendo a las condiciones del efluente a tratar, se esperaba una proliferación de bacterias desnitrificantes frente a otras comunidades. Esta proliferación se observó para todos los ensayos realizados independientemente de la fuente de carbono empleada y de la presencia o no de oxígeno disuelto en el agua a tratar. Junto con este crecimiento, se observó también una proliferación de las bacterias reductoras de nitrato y por lo tanto de los heterótrofos capaces de crecer sin oxígeno. Este crecimiento de heterótrofos se debía fundamentalmente al incremento de los desnitrificantes y reductores de nitrato observándose un descenso del resto de bacterias presentes en los recuentos de heterótrofos.

El crecimiento de las comunidades bacterias que formaban la biopelícula, así como del tamaño de esta, estaba altamente correlacionado con el aumento de la relación C/N y por lo tanto, al ser constante la concentración de nitrato en el agua, se correlacionaban con el incremento de la fuente de carbono. Este crecimiento obedece no solo a procesos catabólicos sino también a procesos anabólicos de la flora heterótrofa, la cual emplea como fuente de C asimilable, la adicionada al sistema, encontrando además cantidades necesarias de N, P, S y oligoelementos en el agua subterránea a tratar. Las bacterias mediante procesos catabólicos (respiración) obtendrán energía, parte de la cual la emplearán en la biosíntesis de nuevos componentes celulares que los llevarán a la multiplicación (Madigan *et al*, 1997).

Atendiendo a esto en el sistema habrá una eliminación de nitrato debida al empleo de este en una cadena de transporte de electrones, para producir energía, y por otro lado se asimilará, pasando a formar parte de compuestos celulares como las proteínas. Autores como Richard y Partos (1986) o Rogalla *et al* (1990), hablaban de una producción de peso seco de biopelícula, en sistemas de eliminación de nitrato de 0.9 Kg/ kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup> eliminado. Esto hacía presuponer que no solo se eliminaba nitrato por su reducción desasimilatoria, sino también por su asimilación,

pasando a formar parte de la biopelícula. En nuestros ensayos, esta eliminación vía anabólica de nitrato quedaba patente en el incremento del tamaño de la biopelícula el cual estaba íntimamente correlacionado con la eliminación de nitrato del efluente a tratar. Dicha correlación se observaba en todos los ensayos realizados.

Al margen de la tendencia creciente que manifestaba la biopelícula en todos los ensayos, el tamaño alcanzado por esta no fue igual en todos los casos, destacando sobre el resto la sacarosa, tanto en los ensayos realizados con y sin oxígeno. Si atendemos a los recuentos de heterótrofos en la biopelícula y su densidad bacteriana, esta era mucho menor en las biopelículas desarrolladas con esta fuente de carbono, debido tanto al aumento del tamaño de la biopelícula como al menor crecimiento bacteriano experimentado. Samrakandi *et al* (1997) observaron como la producción de exopolisacárido de una biopelícula constituida por enterobacterias, se disparaba considerablemente al emplear como fuente de carbono la sacarosa. Atendiendo a esto, se podría pensar que en estos ensayos existía una mayor formación de exopolisacárido que con el resto de las fuentes de carbono ensayadas, dando lugar a una biopelícula de mayor espesor y menor densidad. Este tipo de crecimiento da lugar a una mayor pérdida de carga en el filtro, produciendo finalmente una oclusión que altera el correcto funcionamiento del sistema, tal como sucedió en los ensayos con sacarosa y sin oxígeno en el agua a tratar.

Por otro lado, hay que considerar que el incremento del espesor de la biopelícula dificulta la transferencia de nutrientes al interior (Bishop, *et al*, 1995), por lo que los microorganismos de las capas internas disponen de menor cantidad de nutrientes. Debido a esto, disminuye su actividad metabólica y la biopelícula finalmente termina por desprenderse (Metcalf and Eddy, 1991). Estos desprendimientos dan lugar a un aumento en el contenido de partículas en suspensión en el agua tratada, lo que incrementa la turbidez, obligando a tratamientos posteriores.

Zhang and Bishop (1994a) indicaban que en biopelícula con alto espesor se observaba un descenso en las bacterias metabólicamente activas, que iba desde el 83-92% en las capas superficiales, hasta un 5-11% en las capas profundas. En estas zonas los 2/3 de la biopelícula son

materia inerte y el resto bacterias, de las cuales solo entre 1/4 o 1/7 eran activas metabólicamente y el resto estaban latentizadas. Esto era diferente para las biopelículas de menor espesor, en las cuales las bacterias activas variaban desde un 83-86% en las capas superficiales a un 57-73% en las capas profundas. Basándonos en esta idea, la biopelícula obtenida con sacarosa tendría una capa superficial muy activa donde se consumirían rápidamente los nutrientes, estos no pasarían al interior, donde la cantidad de bacteria viables sería cada vez más baja. Si a esto le unimos una alta producción de exopolisacárido, la densidad de bacterias vivas en la biopelícula cada vez sería menor.

Esto explicaría la mayor pérdida de rendimiento en el sistema al aparecer oxígeno, cuando se emplea sacarosa. El O<sub>2</sub> sería preferido como aceptor de electrones, en lugar del nitrato y se consumiría cierta cantidad de fuente de carbono empleando oxígeno como aceptor. Habría pues que aumentar la dosis de sacarosa para permitir la eliminación total de nitrato. Por otro lado los reductores transformarían el nitrato a nitrito, sin eliminarse este vía desnitrificación, al existir oxígeno y nitrato en el medio. Todos estos procesos se darían mayoritariamente en las capas superficiales de la biopelícula.

En los ensayos realizados con etanol y metanol se observaba un tamaño de biopelícula inferior al obtenido para la sacarosa, por lo que la difusión de nutrientes hacia las capas internas era mayor. Nuevamente en presencia de oxígeno, este sería preferido por las bacterias como aceptor de electrones, consumiéndose rápidamente en la capa externa. Por su consumo rápido en el exterior, el oxígeno vería limitada su difusión hacia el interior (Zhang *et al*, 1994), donde en este caso y por el menor espesor de la biopelícula se difundiría el nitrato y el nitrito producido, así como la fuente de carbono. En las capas internas habría anoxia y el nitrato y nitrito se emplearían vía desnitrificación.

Los valores de desnitrificantes estaban muy correlacionados con el rendimiento del proceso. Rosen y Welander (1994) observaron como para sistemas con una capacidad de eliminación de nitrógeno de 0.0031 Kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ m<sup>2</sup>·día solo el 5% de las bacterias aisladas de la

biopelícula eran desnitrificantes. Para nuestra planta piloto los porcentajes de bacterias desnitrificantes, experimentaba un crecimiento en los recuentos, conforme se aumentaba la dosificación de fuente de carbono, aumentando de forma directamente proporcional el rendimiento. En los puntos donde se obtenía el máximo rendimiento (0.91 Kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ m<sup>2</sup>·día), independientemente de la fuente de carbono empleada, los valores de los recuentos eran semejantes, representando estos algo más del 50% del total de los heterótrofos.

Un factor que si afectaba a los recuentos era la presencia de oxígeno, siendo estos menores para todas las fuentes de carbono ensayadas, cuando el O<sub>2</sub> estaba presente. Este efecto también se observaba en la fase de formación de la biopelícula, en la cual los recuentos de desnitrificantes eran un 10% inferiores en aquellas biopelículas formadas en presencia de oxígeno. Igualmente su crecimiento estaba fuertemente correlacionado con el aumento del rendimiento y volvían a representar algo más del 50% de los heterótrofos obtenidos en los recuentos.

El oxígeno limitaba el crecimiento de los desnitrificantes, pero no solo afectaba a estos, también descendían los heterótrofos que no se agrupaban entre los desnitrificantes o reductores, así como el tamaño de la biopelícula. La única comunidad que no parecía afectarse eran los reductores de nitrato. De este modo el número de reductores de nitrato, frente al de desnitrificantes, aumentaba en presencia de oxígeno, siendo responsable de las mayores acumulaciones de nitrito, ya que el producido por los reductores no se eliminaba totalmente por los desnitrificantes.

Estos descensos en las comunidades que forman la biopelícula indicaría una disminución en la actividad anabólica, causada por la presencia de oxígeno. Ahora bien según Janh *et al* (1996) la presencia de oxígeno supondría un incremento de la cantidad de proteínas que componen la biopelícula, por lo que aumentaría la cantidad de N y C que pasaría a formar parte de estas. Esto podría explicar el consumo total del nitrógeno presente en el agua a pesar de aparecer menores recuentos bacterianos. Por otro lado justificaría parte del mayor consumo de fuente de carbono al emplearse esta en la formación de las proteínas. Estas biopelículas sería de menor espesor y

tendrían mayor adherencia por su contenido en proteínas (Jahn and Nielsen, 1995).

Por otro lado Jahn *et al* (1996), afirmaban que la limitación de oxígeno en una biopelícula compuesta por *Pseudomonas*, era causa de un mayor incremento en el espesor de esta. Este incremento, debido probablemente a un aumento en la producción de exopolisacárido, junto con las condiciones adecuadas para la proliferación de desnitrificantes eran responsables del mayor tamaño y crecimiento bacteriano obtenido en las fases sin oxígeno.

#### **4.- COMPOSICIÓN Y ACTIVIDAD DESNITRIFICANTE DE LA BIOPELÍCULA.**

A pesar de la amplia diversidad morfológica y fisiológica que caracteriza a los desnitrificantes, los microorganismos aislados en la biopelícula desarrollada en la planta piloto se incluían todos en la sección 4 del *Bergey's Manual* (1984), correspondiéndose con los bacilos y cocos aerobios gram negativos. No se aislaron desnitrificantes pertenecientes a otros grupos como bacterias espirales o bacilos gran-positivos, a pesar de aislarse estos de agua y suelo, al igual que los obtenidos de la planta piloto. Este tipo de bacterias son poco frecuentes en los sistemas biológicos de eliminación de nutrientes (Eikelboom and Buijsen, 1981; Brodisch and Joyner, 1983).

En nuestros ensayos se detectaron 12 especies diferentes, pertenecientes la mayoría de ellas al género *Pseudomonas*, género que se ha relacionado con la desnitrificación en los sistemas biológicos de eliminación de nitrógeno (Kavanaugh, 1994). Todos los aislados se encuentran habitualmente en aguas, suelos o muestras humanas y a su vez son heterótrofos, por lo que es lógico encontrarlos en el licor mezcla de un reactor de fangos activados. Por otro lado y debido a las condiciones de oxigenación de un reactor de fangos y a la pequeña concentración de nitrato presente en el licor mezcla, no suelen estar en alta concentración, tal como se observaba en la fase de formación de la biopelícula.

Las especies desnitrificantes presentes inicialmente en la biopelícula tendían a desaparecer o a aumentar en número, con el incremento de la fuente de carbono, por lo que esta no afectaba por igual a todos los desnitrificantes. Especies como Agrobacterium radiobacter presentes en la fase de formación de la biopelícula aumentaban en número, a mayores concentraciones de fuente de carbono, sucediéndole todo lo contrario a Moraxella spp. y Alcaligenes denitrificans que para altas relaciones C/N no se aislaban en los recuentos. Por regla general, para todas las fuentes de carbono se apreciaba un aumento de la biodiversidad de bacterias desnitrificantes, conforme aumentaba la concentración de carbono.

Debido a que el agua a tratar era subterránea, la carga bacteriana esperada era muy baja, con respecto a la presente en la biopelícula. En estas aguas hay bacterias desnitrificantes por la presencia de altas concentraciones de nitrato y baja de oxígeno, pero la poca concentración de materia orgánica, limita el crecimiento de heterótrofos, los cuales están en número muy limitado (Chapelle, 1992). Lógicamente estas bacterias pueden quedar atrapadas en la matriz polimérica y proliferar en la biopelícula, pero la alta competencia por los nutrientes en las capas superficiales de la biopelícula y el bajo número en que estas bacterias se encuentran, hacen difícil que sean las responsables del incremento en la biodiversidad. Lo más lógico es que esta biodiversidad existiese en la fase de formación de la biopelícula, pero las bacterias desnitrificantes se encontraban en bajo número por lo que no eran detectadas en los recuentos ( se realizan con diluciones de  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ ). Las condiciones favorables de nitrato y fuente de carbono hacen que incrementen en número, detectándose para relaciones C/N mayores.

Esta proliferación, como indicábamos anteriormente, no afecta por igual a todas las especies desnitrificantes, algunas de las cuales no encuentran sus condiciones favorables de desarrollo y no pueden competir con el resto. Esto mismo sucedía con la totalidad de bacterias desnitrificantes que componen la biopelícula, si se limitaba la fuente de carbono, las cuales descenderían proliferando otras comunidades. Las biopelículas están en continuo dinamismo, manifestándose una constante competencia por los nutrientes (Zhang *et al*, 1994), lo que permite las variaciones de población producidas por la variación de las condiciones. Esto nos obliga a

mantener las condiciones de trabajo, permitiendo así una mayor presencia de desnitrificantes en nuestra biopelícula.

En los recuentos se observó una variación en la especie dominante, conforme aumentaba la fuente de carbono. Esta variación podía deberse a la presencia o no de dicha especie en la fase de formación de la biopelícula. Así Ps. fluorescens, especie a la cual no parece afectarle la presencia de oxígeno, solo se detectó para la sacarosa sin oxígeno y metanol con oxígeno. En ambos casos era la especie dominante y se aisló en la fase de formación de la biopelícula. Para el resto de estudios no se aisló en ninguna de las relaciones C/N ensayadas. Agr. radiobacter se aislaba en todos los ensayos, pero sus recuentos variaban en función de la fuente de carbono ensayada. Así para los ensayos con metanol era la especie dominante, tanto con oxígeno como sin el, mientras que para la sacarosa y el etanol no lo era. Sus recuentos en estos ensayos eran menores que para el metanol, especialmente para el etanol. Otro ejemplo lo manifestaba Ps. picketti para la que se obtenían altos recuentos con los alcoholes y sin embargo para la sacarosa eran más bajos.

La presencia o no de oxígeno disuelto en el agua a tratar variaba también la proliferación de las diferentes especies, no afectando a todas por igual. Así para Agr. radiobacter, en los ensayos de etanol se apreciaba un crecimiento que alcanzaba valores de  $5.4 \cdot 10^7$  ufc/g relleno, mientras que con oxígeno alcanzaba un máximo de  $0.9 \cdot 10^7$  ufc/g relleno. Esto mismo sucedía con Ps. picketti, que sin oxígeno alcanzaba un recuento de  $11.46 \cdot 10^7$  ufc/g relleno en la fase de máximo rendimiento y con oxígeno el recuento solo era de  $1.2 \cdot 10^7$  ufc/g relleno. Casos semejantes sucedían empleando metanol, para Al. denitrificans o Ps. stutzeri, aunque el efecto era diferente. La presencia de oxígeno aumentaba los recuentos de Al. denitrificans y descendía los de Ps. stutzeri, sucediendo al contrario en ausencia de oxígeno. La presencia de oxígeno no afectaba por igual a todas las especies, aunque por regla general, el crecimiento de desnitrificantes era menor si había oxígeno disuelto en el agua a tratar.

La presencia de oxígeno no debía limitar el crecimiento de bacterias desnitrificantes,

aisladas en estas biopelículas, al ser estas aerobias, pero su presencia tampoco limitaría el crecimiento de otros grupos bacterianos que si estarían limitados en presencia solo de nitrato. A pesar de esto no se observó una gran diferencia en los porcentajes de desnitrificantes cuando había o no oxígeno disuelto en el agua a tratar.

La diferente composición de la biopelícula, en función de la fuente de carbono empleada, podría explicar algunos de los comportamientos de esta. Lazzarova *et al* (1994) afirmaba que la acumulación de nitrito en procesos de desnitrificación, obedecía a las diferentes especies bacterianas implicadas en el proceso, indicando que la presencia de cepas de Ps. aeruginosa daban lugar a una mayor acumulación de este nitrito, que si la especie responsable era Ps. stutzeri. Anteriormente Betlach y Tiedje (1981) afirmaban que un efecto semejante se producía cuando las especies Ps. fluorescens ó Alcaligenes spp. eran las responsables del proceso de desnitrificación. La presencia de estas bacterias, podría obedecer a la mayor acumulación de nitrito en los ensayos con sacarosa, sin embargo al observar los aislamientos, se veía que en el proceso con oxígeno, donde más nitrito se acumulaba, ninguna de estas especies estaba presente y si Ps. stutzeri. Por otro lado, en los ensayos sin oxígeno Ps. fluorescens era la especie predominante y también se aislaban cepas de Al. denitrificans. Estas especies también se aislaban en los ensayos con metanol y etanol donde las concentraciones de nitrito eran menores.

Otra causa que podría incrementar las concentraciones de nitrito era el efecto inhibitor que el oxígeno realizada, a nivel genético, evitando así la síntesis de la nitrito reductasa. Este efecto fue descrito por Thomas *et al* (1994) en cepas de Ps. stutzeri, las cuales estaban presentes en la biopelícula formada en los ensayos con sacarosa y oxígeno. Ahora bien, al margen de este efecto hay que indicar que esta especie no era la única desnitrificante presente en estos ensayos y que otras causas como la mayor presencia de reductores de nitrato, junto con este efecto inhibitor, podían ser el motivo de la acumulación de nitrito. Para mayores relaciones C/N los desnitrificantes aumentaba, incluido Ps. stutzeri, con respecto a los reductores de nitrato y las concentraciones de nitrito desaparecían.

Al contrario de lo sucedido con el número de bacterias desnitrificantes, las cuales crecían con el incremento de la dosificación de la fuente de carbono, la actividad desnitrificante de estas bacterias aisladas parecía estar más relacionada con la especie bacteriana que con las condiciones ambientales establecidas en la biopelícula. Especies como Agr. radiobacter ó Ps. fluorescens presentaban por lo general una alta capacidad de producción de  $N_2O$ , en medios de cultivo sin limitación en nitrato ni en la fuente de carbono, mientras que otras como Moraxella spp. Ps. pseudoflava, Ps. solanacearum ó Ps. mallei presentaban una actividad muy inferior a la media de todas las obtenidas en los ensayos realizados.

La presencia de oxígeno parecía afectar a la actividad desnitrificante de las cepas bacterianas presentes en la biopelícula, ahora bien esta influencia era diferente en función de la fuente de carbono empleada. Por lo general, de todas las bacterias aisladas en presencia de oxígeno, el 44% presentaban una actividad desnitrificante superior a la media, mientras que de las aisladas en ensayos sin oxígeno solo el 30% presentaban esta alta actividad. Esto se mantenía cuando la fuente de carbono empleada eran los alcoholes, siendo superior para el metanol. Por lo contrario, cuando la fuente de carbono era la sacarosa, la actividad era superior en las cepas aisladas de la fase sin oxígeno. Esto podía ser causa del mayor tamaño que alcanzaba la biopelícula en los ensayos con sacarosa. En estos casos la difusión de nutrientes estaría limitada y la proliferación bacteriana se daría solo en las capas superficiales, en las cuales en presencia de oxígeno se limitaría no solo la proliferación de desnitrificantes, sino también su actividad. Debido a ello esta actividad y el crecimiento bacteriano era mayor sin oxígeno.

Para los alcoholes el crecimiento de la biopelícula era menor y por lo tanto la difusión de nutrientes no estaría tan limitada. A excepción del oxígeno, que sería rápidamente consumido en las capas superficiales (Riethues *et al*, 1986), tanto el nitrato como la fuente de carbono difundirían al interior, donde la actividad desnitrificante sería más alta tanto con oxígeno como sin el. En los ensayos sin oxígeno el crecimiento bacteriano era mayor y por lo tanto había una competición por los nutrientes más fuerte. Las cepas que precisan más nitrato y fuente de carbono (las más activas), ven limitado su crecimiento frente a las que precisan menos, las cuales son más

competitivas en estas biopelículas.

Si se sumaban los producto entre el recuento y la actividad desnitrificante, obtenido para cada especie bacteriana aislada de la biopelícula, se obtenía un valor que se podría considerar como la actividad potencial de cada biopelícula para cada relación C/N. Estos valores hipotéticos no representan a la actividad bacteriana en la biopelícula, pero nos pueden dar una idea de lo sucedido. En una biopelícula heterótrofa en la cual se produce desnitrificación, hay un consumo de nitrógeno por vía asimilatoria y desasimilatoria. Atendiendo a los valores hipotéticos obtenidos para la sacarosa, se observaba una alta diferencia entre los ensayos con y sin oxígeno, siendo esta actividad inferior en presencia de oxígeno. Esto se debía principalmente al menor crecimiento bacteriano y a la menor proliferación de bacterias activas. En este caso se podría justificar la acumulación de nitrito, ya que como se indicaba anteriormente, la actividad desnitrificante era muy baja y el nitrito producido por la actividad de los reductores de nitrato, así como el bloqueo genético que el oxígeno hacía a nivel de la nitrito reductasa, no era eliminado precisándose mayor concentración de fuente de carbono para su eliminación.

Trabajando al 100% de rendimiento, en las condiciones de trabajo establecidas, se eliminaban cerca de 65 g de nitrato diarios. Si atendemos a la actividad desnitrificante potencial, calculada en los ensayos con sacarosa sin oxígeno y para la relación C/N 2.5 (Se eliminaba todo el nitrato), esta era de 135.9 nmol/h lo cual indica una capacidad de eliminación vía desnitrificación suficiente como para eliminar todo el nitrato que diariamente se aplicaba al sistema. Si observamos los valores para el ensayo con oxígeno la actividad potencial solo era de 28.8 nmol/h. En este caso la eliminación de nitrato era menor tanto por vía asimilatoria (poco crecimiento), como por vía desasimilatoria (poca actividad desnitrificante), por lo tanto debía aumentarse mucho más la adición de fuente de carbono para conseguir eliminar todo el nitrato.

Para el metanol las actividades potenciales eran semejantes tanto si había o no oxígeno disuelto en el agua a tratar, compensándose la mayor actividad desnitrificante obtenida en las fases con oxígeno, con el mayor crecimiento bacteriano dado en las fases sin oxígeno. En este caso la

actividad potencial aumentaba con el incremento en la fuente de carbono, debido principalmente al crecimiento bacteriano. Para el etanol si se apreciaban mayores diferencias entre las fases con y sin oxígeno, debido lógicamente al mayor crecimiento bacteriano experimentado en la fase sin oxígeno. En este caso se precisaba también más fuente de carbono en los ensayos con oxígeno (C/N=1.3), que permitiera una mayor eliminación de nitrato.

Si fraccionamos la actividad potencial obtenida en los ensayos con metanol, en función de las cepas bacterianas que los producen, se observaba que para los ensayos con oxígeno, la mayor actividad dada en los puntos de máximo rendimiento (2/3) la producía *Ps. mendocina*. Esta especie no era la más activa para esta relación C/N, siendo en este caso *Ps. alcaligenes* y *Agr. radiobacter*. Ahora bien, la adaptación al etanol como fuente de carbono no parecía ser buena para estas cepas, las cuales alcanzaban menores recuentos que cuando se empleaba otra fuente de carbono. Debido a esto, a pesar de su alta actividad, no presentaban un alto potencial de eliminación de nitrato en la biopelícula, por sus bajos recuentos. El caso contrario sucedía con *Ps. pickettii*, la cual a pesar de desarrollarse bien en estas condiciones, no tenía una buena actividad desnitrificante, lo cual descendía su capacidad de eliminar nitrato en la biopelícula.

En los ensayos sin oxígeno, sucedía algo semejante. Nuevamente *Ps. pickettii* crecía bien, adaptándose perfectamente a las condiciones de la biopelícula, pero su baja actividad descendía la capacidad de eliminación de nitrato por parte de esta especie. *Agr. radiobacter* tenía un mayor potencial de eliminación ya que su actividad era más alta, compensando así su pobre crecimiento. Para este ensayo el principal responsable de la eliminación de nitrato, vía desnitrificación, era *Al. denitrificans*, la cual presentaba una alta actividad y crecía abundantemente, conforme se incrementaba la fuente de carbono.

Tanto *Ps. mendocina* como *Al. denitrificans*, en sus respectivos ensayos, representaban un alto número de bacterias presentes en la biopelícula, siendo este del 36% y 24.6% respectivamente. El resto lo formaban otros desnitrificantes, así como bacterias de otras comunidades. Esta concentración de cepas desnitrificantes con alta actividad era responsable del

mayor rendimiento del sistema con respecto a otros como el descrito por Rosen y Welander (1994) en el que solo un 5% de las cepas que componían la biopelícula eran desnitrificantes. Esto mismo sucedía para todos los ensayos en los que la presencia de una cepa dominante con alta actividad desnitrificante, representaba la práctica totalidad de la capacidad de eliminar nitrato, vía desasimilatoria. Considerando que en estos sistemas de tratamiento de aguas subterráneas, la composición de la biopelícula se debe al inóculo inicial, el empleo de cepas bacterianas con alto poder desnitrificante y con gran capacidad de adaptación a estas condiciones de trabajo, como inoculantes, podría aumentar la capacidad de eliminación de nitrato de estos sistemas.

La obtención de inóculos con alta densidad bacteriana es una tarea sencilla, empleando para ello técnicas de fermentación o cultivos en medios líquidos enriquecidos (Lazarova *et al*, 1994). La recirculación de este inóculo a través del filtro sumergido, así como la adición de nutrientes al medio (Peytons, 1996), facilitaría la colonización del relleno por las cepas bacterianas que forman el inóculo. Ahora bien, Lazarova y Manen (1995) afirmaban que las condiciones del sistema, en la fase de formación de la biopelícula, podían influir sobre caracteres como el espesor, la densidad o la capacidad de difusión de nutrientes, los cuales influirán en el funcionamiento del sistema, en la capacidad de eliminación de nutrientes y en la viabilidad de la biopelícula. Atendiendo a esto, se precisaría de mayores estudios que nos llevaran a conocer cuales son los principales parámetros físico-químicos a controlar (Shreve *et al*, 1991) y cuales son las características del inóculo más adecuadas (Ehlinger *et al*, 1987), para una correcta formación de la biopelícula.

El empleo de estos inóculos minimizaría el tiempo de arranque del sistema y aumentaría la capacidad de eliminación de nitrato por parte de la biopelícula, descendiendo así los costes del proceso y el volumen de la instalación. Faltaría por ver si dichas cepas son capaces por si solas de formar una biopelícula y crecer en ella o por lo contrario necesitan de la presencia de otras bacterias para crecer. Futuras investigaciones en esta línea podrían ofrecer resultados ventajosos para la aplicación de estos sistemas.

## 5.- INFLUENCIA DE LA CARGA DE NITRATO Y EL CAUDAL DE TRABAJO.

Los sistemas de biopelícula fija, presentan como ventaja, el poder mantener una alta carga bacteriana por unidad de volumen (Okabe *et al*, 1995). Esto permite reducir considerablemente el volumen de reactor precisado (Janning *et al*, 1995). Según el CEDEX (1994), para el diseño de estos sistemas, lógicamente se precisa conocer cual es el volumen de reactor adecuado para eliminar la cantidad de nitrato contenida en el efluente a tratar (carga volúmica), así como la superficie de reactor necesaria para tratar el caudal de agua necesario (carga hidráulica). Para conocer que valores serían los idoneos, se varió tanto la concentración de nitrato en el agua de entrada, así como el caudal de trabajo.

Al variar la concentración de nitrato en el efluente a tratar, se aumentaba la carga superficial desde 0.45 a 2.7 kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ m<sup>2</sup>·día. Los rendimientos máximos obtenidos eran del 100% hasta la carga 1.83 Kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ m<sup>2</sup>·día, descendiendo posteriormente para mayores cargas, a pesar de aumentar la dosificación de fuente de carbono. Ya para 2.37 kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ m<sup>2</sup>·día se apreciaban valores de nitrato y nitrito en el agua de salida. Las concentraciones de nitrato estaban dentro de los márgenes permitidos por la legislación, pero no los de nitrito, por lo que se precisarían posteriores tratamientos para eliminarlo.

Para los ensayos con cargas mayores, no solo se detectaba nitrato y nitrito en la salida, sino también etanol. La relación C/N en el agua de salida era de 1.36, valor adecuado para la eliminación de nitrógeno en estos sistemas, sin embargo no se eliminaban. Nurizzo y Mezzanotte (1992), afirmaban que la presencia de nitrito en el agua de salida se debía a un insuficiente tiempo de contacto. Atendiendo a esto la presencia de estos nutrientes podrían deberse a una necesidad de mayor permanencia del efluente en el interior del filtro sumergido, precisando para ello un menor caudal de trabajo o un mayor volumen de reactor.

Si estudiamos la evolución de las concentraciones de compuestos nitrogenados en función

de la altura del lecho biológico, vemos como, independientemente de la carga ensayada, se apreciaban diferencias en las concentraciones a mayor altura a excepción de 123 y 200 cm. Para estas alturas y para cargas superficiales inferiores a  $2.31 \text{ kg NO}_3^-/\text{m}^2\cdot\text{día}$ , las concentraciones de nitrato y nitrito eran poco significativas, no precisándose esta parte del reactor para eliminarlas.

Así para una carga superficial de  $1.39 \text{ kg NO}_3^-/\text{m}^2\cdot\text{día}$  se precisaba una altura de lecho de 56 cm, para descender las concentraciones de nitrato a las permitida para su uso público. En este caso la carga volúmica máxima sería de  $2.39 \text{ kg NO}_3^-/\text{m}^3\cdot\text{día}$ . Si aumentáramos la concentración de nitrato (carga superficial  $1.85 \text{ kg NO}_3^-/\text{m}^2\cdot\text{día}$ ), esta altura aumentaba hasta 91 cm y hasta 116 cm para la carga superficial  $2.31 \text{ kg NO}_3^-/\text{m}^2\cdot\text{día}$ . Para estas cargas superficiales, la carga volúmica óptima era de  $2.03 \text{ kg NO}_3^-/\text{m}^3\cdot\text{día}$  y  $1.99 \text{ kg NO}_3^-/\text{m}^3\cdot\text{día}$ , respectivamente. Conforme aumentaba la concentración de nitrato en el agua contaminada, descendía la carga volúmica necesaria para tratarla, aumentando por lo tanto el tiempo de contacto.

Este mayor tiempo de contacto se podría conseguir descendiendo el caudal de trabajo, pero con ello se descendería aun más la carga volúmica. Para mantener esta, se podría aumentar la altura del lecho o bien incrementar la superficie del reactor, con lo que descendería la carga superficial y por lo tanto la altura de lecho precisado. En nuestros ensayos la superficie era fija ( $0.071 \text{ m}^2$ ), por lo que se precisaría estudiar la influencia que tendrían las variaciones de carga superficial, debidas a variaciones en la superficie del reactor.

Los consumos de etanol aumentaban conforme se aumentaba la carga superficial, de modo paralelo al incremento en la eliminación de nitrato. Los consumos oscilaban entre 0.37 y 0.51 unidades de etanol por unidad de nitrato eliminado, tendiendo a aumentar para mayores cargas superficiales. A pesar de estas necesidades de fuente de carbono, las concentraciones de etanol dosificadas eran mayores a las consumidas, detectándose en la salida prácticamente para todos los ensayos, no obstante, los descensos en las dosificaciones hacían descender los rendimientos.

Si atendemos a los valores del tamaño de la biopelícula, existían diferencias en estos

conforme se aumentaba la carga superficial. A mayor carga superficial, mayor cantidad de nitrato se eliminaba y mayor cantidad de carbono se consumía y por lo tanto mayor crecimiento experimentaba la biopelícula. Este incremento se observó también en los heterótrofos así como en las bacterias desnitrificantes. Ahora bien la densidad bacteriana aumentaba conforme se incrementaban las cargas, ya que el crecimiento bacteriano era superior al del tamaño de la biopelícula. Van Loosdrecht *et al* (1995) afirmaban que la densidad de una biopelícula era menor cuanto mayor concentración de nutrientes aparecían en el medio, tal como sucedía en los ensayos con sacarosa. Ahora bien, en biopelículas en las que se empleaba etanol esta densidad bacteriana aumentaba, debido a una mayor proliferación bacteriana y menor producción de componentes extracelulares en la matriz polimérica. Estos crecimientos de la biopelícula y de las bacterias que la componen, obedecían a una mayor eliminación de nutrientes, los cuales se consumían tanto por procesos anabólicos, como catabólicos (desnitrificación), que aportarían la energía necesaria para la proliferación bacteriana. El consumo de etanol produciría mayor cantidad de energía en forma de ATP, lo cual se traduciría en una proliferación bacteriana óptima si había suficientes nutrientes presentes.

Los crecimientos de la biopelícula variaban también en función de la altura del lecho y estaba lógicamente relacionada con la concentración de N y C disponibles. Para alturas bajas el crecimiento de la biopelícula era mayor, al igual que el de las bacterias que la componen. la densidad bacteriana también descendía con la altura al ser menor la concentración de nutrientes disponibles. Estos diferentes crecimientos, en función de la altura, planteaban problemas de atasco del sistema, aumentando las necesidades de lavado. Por otro lado la menor densidad bacteriana de las biopelículas observada al aumentar la altura, daba lugar a biopelículas menos activas en la eliminación de nitrógeno.

Atendiendo al apartado anterior, se aprecia como en estos sistemas hay un pérdida de efectividad de la superficie de contacto, si solo se trabaja con flujo ascendente y se piensa que puede suceder lo mismo si el flujo es descendente, ya que tanto el tamaño de la biopelícula como la composición en desnitrificantes varía con la altura del sistema. Una alternancia de flujos

permitiría aportar al sistema un efluente con alta carga tanto por la parte superior como por la inferior, por lo que se desarrollaría una biopelícula de iguales características en ambas zonas. Esto permitiría aumentar el caudal de trabajo, así como la carga contaminante del efluente a tratar, ya que a pesar de incrementarse la concentración de nitrato y nitrito que llegaría al extremo final del cilindro del reactor, en este habría una biopelícula con mayor presencia de bacterias desnitrificantes, capaz de eliminarlos. Con estas características se aumentaría la carga volúmica, descendiendo así el volumen de reactor. Por otro lado las necesidades de lavado serían inferiores, ya que se alternaría la entrada de alta carga de nutrientes, por lo que el crecimiento de la biopelícula sería menor aumentando así el tiempo de obstrucción del sistema. Habría, sin embargo, que tener en cuenta la respuesta de los microorganismos a estas alternancias de flujo y cuales serían las necesidades de fuente de carbono, por lo que se precisarían nuevos estudios en esta línea de trabajo.

Los reductores de nitrato no experimentaban un descenso en sus recuentos entre las alturas 10 cm y 66 cm al igual que sucedía para los desnitrificantes. Aunque si lo experimentaban en función de las diferentes concentraciones de nutrientes dadas por la variación de la carga superficial. Entre la altura 10 y 66 cm se obtenían las mayores concentraciones de nitrito que posteriormente serían eliminadas para mayores alturas, en las que si se apreciaba un descenso de los reductores, al encontrarse menores concentraciones de nitrato disponible. Esto condicionaba la reducción de la altura del lecho por debajo de estas zonas, ya que el nitrito de salida sería alto y se precisarían posteriores tratamientos del agua de salida, para adecuarla a las exigencias legislativas.

Los incrementos de caudal, lógicamente suponen un incremento en la carga superficial, por lo que las variaciones de caudal entre 13.8 a 54 l/h dan una oscilación de cargas superficiales entre 0.47 y 1.86 kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ m<sup>2</sup>·día y de cargas hidráulicas entre 4.86 y 18.33 m<sup>3</sup>/ m<sup>2</sup>·día. Al igual que sucedía cuando se variaban las concentraciones de nitrato del efluente a tratar, conforme aumentaba la carga superficial, se observaban ciertas concentraciones de nitrato y nitrito en el agua de salida, no lográndose un 100% de rendimiento. En los ensayos con aumento de la carga

contaminante, el caudal era de 27 l/h, detectándose nitrógeno en el agua de salida para una concentración de 200 mg/l de nitrato, o bien para una carga superficial de 1.83 kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ m<sup>2</sup>·día. Cuando se variaba el caudal, el nitrógeno se detectaba en el agua de salida para una concentración de 100 mg/l de nitrato y un caudal de 33 l/h, lo que suponía una carga superficial de 1.12 kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ m<sup>2</sup>·día. Los incrementos de caudal daban lugar a un menor tiempo de retención del agua en el reactor biológico, por lo que el rendimiento descendía para menores cargas superficiales.

El máximo caudal ensayado fue de 54 l/h, para el que se detectaba en el agua de salida valores de nitrato, que estaban dentro del margen permitido por la legislación, no sucediendo igual con la concentración de nitrito, para la que se registraban concentraciones que duplicaban las máximas obtenidas en los ensayos con variación de carga contaminante. Esto obligaba a un tratamiento más exhaustivo del efluente tratado para eliminar el nitrito. Hay que indicar que las concentraciones de etanol en el agua de salida crecían de modo paralelo a las de nitrato y nitrito, conforme aumentaba la carga hidráulica.

Nuevamente el consumo de etanol era paralelo a la eliminación de nitrato, oscilando las necesidades de este entre 0.43 y 0.52 unidades de etanol por unidad de nitrato eliminado, valores semejantes a los registrados en los estudios anteriores.

Si atendemos a las concentraciones medias de nitrógeno para cada altura, se observa que conforme aumentaba la altura esta concentración descendía no existiendo semejanzas entre alturas. Los incrementos de caudal precisaban mayor altura para mantener igual tiempo de contacto y eliminar así el nitrato del agua. Esta mayor altura se apreciaba para cargas superiores a 10.18 m<sup>3</sup>/ m<sup>2</sup>·día, siendo de 50 cm tanto para esta carga hidráulica como para las inferiores ensayadas. En este caso la carga volúmica era de 2.04 kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ m<sup>3</sup>·día.

Para mayores cargas hidráulicas, la altura de lecho era mayor, siendo esta de 70 cm para 14.26 m<sup>3</sup>/ m<sup>2</sup>·día; lo que suponía una carga volúmica de 2.04 kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ m<sup>3</sup>·día. Esta aumentaba a 2.26 kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ m<sup>3</sup>·día, para la carga hidráulica 18.33 m<sup>3</sup>/ m<sup>2</sup>·día, con la que la altura de lecho

precisada era de 81 cm.

Para estas cargas la concentración de nitrito en el agua de salida experimentaba un crecimiento, alcanzando la concentración de 6 mg/l y a pesar de aumentar la altura del lecho esta no descendía. Si observamos la evolución del nitrito dentro del reactor biológico, esta alcanzaba su máxima concentración a los diez centímetros, para cargas hidráulicas inferiores a 4.68 m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>·día, desapareciendo posteriormente. Para mayores cargas hidráulicas, la máxima concentración de nitrito se alcanzaba a mayores alturas, siendo esta de 66 cm para 10.18 m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>·día. Ya para cargas hidráulicas superiores las concentraciones máximas se alcanzaban para los 123 cm, no siendo suficiente la altura restante para eliminarlos. Esta presencia de nitrito en el agua de salida, la cual tiende a aumentar para mayores caudales, y las necesidades posteriores de tratar el efluente para eliminarlo, hacen descender la carga hidráulica óptima para el proceso, a pesar de conseguir descender la concentración de nitrógeno a valores permitidos por la legislación.

Atendiendo al tamaño de la biopelícula, esta nuevamente variaba conforme aumentaba la carga hidráulica y también con la altura, sucediendo lo mismo con los heterótrofos y los desnitrificantes. Para mayor carga hidráulica la concentración de nutrientes era más alta y por lo tanto los incrementos de la biopelícula y de las comunidades bacterianas eran mayores. Estos valores descendían al ser menor la concentración de nutrientes, lo que sucedía con menores cargas hidráulicas y con el aumento de la altura.

la densidad bacteriana presentaba un comportamiento diferente al observado en los ensayos con variación de la carga contaminante. Para cargas hidráulicas bajas el comportamiento era semejante, descendiendo la densidad con la altura, pero a mayores cargas hidráulicas, esta densidad aumentaba con la altura. Esto se debía a que con el menor tiempo de retención el arrastre de nutrientes hasta las capas superiores era mayor y por lo tanto el crecimiento bacteriano también.

A pesar de esta variación de la densidad, los principales problemas de atasco del sistema,

seguían produciéndose en las partes bajas de la columna, como consecuencia del efecto que el crecimiento de la biopelícula ejercía sobre la hidrodinámica del agua en el interior de la columna (Lewandowsky and Stoodley, 1995). Nuevamente para estos ensayos queda gran parte de la superficie interior del filtro biológico desaprovechada, por lo que una alternancia de flujo permitiría su influencia en el proceso depurador y se minimizarían los problemas de atasco. Un incremento de la biopelícula a lo largo de todo el reactor aumentaría la masa bacteriana activa frente al nitrato, permitiendo aumentar la carga volúmica del proceso. Lógicamente si la masa bacteriana activa es mayor, el tiempo de retención necesario para depurar el efluente descende, lo que nos permitiría aumentar la carga hidráulica del proceso.

Los reductores de nitrato no experimentaban un descenso semejante al del resto de las comunidades bacterianas, en las partes altas del reactor, cuando se ensayaban cargas hidráulicas altas. Al existir menor tiempo de retención, la concentración de nitrato que alcanza las partes altas de la biopelícula es mayor, por lo que estas comunidades no descienden y la producción de nitrito aumenta en estas zonas. Esto es causa de que se obtenga alta concentración de nitrito en el efluente tratado, para cargas hidráulicas altas.

Los procesos de eliminación biológica de nitrato, mediante filtros sumergidos, son factibles para depurar aguas subterráneas contaminadas con nitrato. Estos sistemas solo precisan la dosificación de una fuente de carbono fácilmente metabolizable, un control sobre la concentración de oxígeno disuelto en el efluente a tratar y un tratamiento posterior del efluente obtenido, consistente en una desinfección, mediante adición de oxidantes, que permita eliminar la carga bacteriana que contienen estos efluentes, tras un tratamiento biológico (Boehler, *et al*, 1994) y transformar en nitrato las posibles concentraciones de nitrito. Ahora bien, los estudios realizados sobre la biopelícula, responsable del proceso depurador, revelan que las bacterias desnitrificantes no son las únicas componentes de la biopelícula y que entre ellas hay diferentes especies con distinta actividad desnitrificante específica. Por otro lado la distribución de la biopelícula a lo largo del reactor, al emplear flujo ascendente, no es homogénea, descendiendo esta con la altura. Atendiendo a esto, un mayor aprovechamiento de la superficie del biofiltro,

homogeneizando el tamaño y composición de la biopelícula en desnitrificantes a lo largo de todo el reactor, mediante alternancia de flujos o la utilización de inóculos, para la formación de la biopelícula, con alto contenido en bacterias desnitrificantes que presenten alta actividad, podrían aumentar considerablemente las cargas hidráulica y volúmica del reactor, permitiéndonos así reducir el volumen de la instalación, aumentar el caudal de trabajo y la carga contaminante del efluente a tratar. Estudios a escala industrial, teniendo en cuenta estas matizaciones, ofrecerían un sistema viable técnica y económicamente que permita la utilización como recurso hídrico de las aguas subterráneas contaminadas con nitrato.

## **VI.- Conclusiones.**

---

Atendiendo a la discusión realizada, del estudio sistemático de los resultados, donde se ha visto la interrelación de la influencia de los distintas variables y parámetros estudiados con la finalidad de alcanzar los objetivos fijados, se pueden extraer las siguientes conclusiones finales.

1ª El etanol se presenta como el mejor aditivo de las tres fuentes de carbono ensayadas. Para iguales rendimientos se precisa menor dosificación, aparecen menores concentraciones de nitrito en el agua de salida y la concentración de fuente de carbono en el agua tratada es inferior, no presentando esta problemas de toxicidad.

2ª La presencia de oxígeno disuelto en el agua a tratar, supone un incremento en el consumo de fuente de carbono para mantener los rendimientos de eliminación de nitrato. Este incremento es menos acusado para el etanol, cuya dosificación debe incrementarse un 11% en presencia de 4.5 mg/l de oxígeno.

3ª Para bajas concentraciones de fuente de carbono y presencia de O.D. aparece nitrito en el agua de salida, cuya concentración dependerá de la dosificación de fuente de carbono y el tipo de esta. Esto obedece a una baja actividad desnitrificante en la biopelícula, la cual no puede eliminar el nitrito producido por los reductores de nitrato. Estas acumulaciones son más destacadas en los ensayos con sacarosa y con oxígeno donde la actividad desnitrificante es muy baja.

4ª Atendiendo a las dosificaciones de fuente de carbono y a los valores teóricos estimados por sus reacciones estequiométricas, en la biopelícula hay un consumo de fuente de carbono para otros procesos metabólicos diferentes a la desnitrificación.

5ª El mayor o menor crecimiento de la biopelícula se debe a la concentración y tipo de fuente de carbono empleada. Para la sacarosa se registran los mayores incrementos, descendiendo la densidad bacteriana. Estas biopelículas son menos activas y dan mayores problemas de atascos.

6ª La proliferación de bacterias desnitrificantes en la biopelícula, precisa de una concentración y tipo de fuente de carbono adecuada, igualmente se influenciará negativamente por la presencia de O.D. Esto explica los diferentes rendimientos del sistema en función de las condiciones de trabajo.

7ª La actividad desnitrificante de las cepas que componen la biopelícula varía en función de la especie bacteriana, mientras que el número de desnitrificantes varían en función de las condiciones de trabajo. La combinación de estos dos factores es la responsable de la mayor o menor eliminación de nitrato en el sistema.

8ª De todas las cepas aisladas de la biopelícula, las de Agrobacterium radiobacter se influncian menos por la fuente de carbono ensayada y por la presencia de O.D., apareciendo en todos los ensayos realizados. A su vez tienen altos valores de actividad desnitrificante.

9ª Los consumos de etanol aumentan conforme aumenta la carga superficial, manteniéndose un relación entre 0.37 y 0.51 unidades de etanol por cada unidad de nitrato eliminado.

10ª En un sistema de filtros sumergidos que trabaja con flujo ascendente, el tamaño de la biopelícula aumenta conforme se incrementa la carga superficial y esta desciende conforme se asciende en altura de lecho. Atendiendo a esto, hay un pérdida de efectividad en parte de la superficie del lecho y los problemas de atasco aumentan conforme se incrementa la carga de nitrato del agua a tratar.

11ª La presencia de nitrito en el agua de salida se incrementa con la carga superficial. Esto es más acusado cuando el incremento de la carga se debe a un aumento de caudal. Así aunque la carga hidráulica no es un parámetro restrictivo para el diseño de la instalación, el incremento de esta aumenta las concentraciones en el agua de salida de nitritos y etanol que obligan a posteriores tratamientos.

12<sup>a</sup> Los valores de carga volúmica óptimos para cumplir con las exigencias legislativas oscilan entre 2.0 y 2.39 Kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ m<sup>3</sup>·día.

13<sup>a</sup> La altura de lecho necesaria se incrementa con la carga superficial, siendo este mayor cuando la variación de la carga se debe a un aumento en la concentración de nitrato más que a un incremento de caudal. Ahora bien para caudales altos, no se logra eliminar la producción de nitrito con mayores alturas.

## **VII.- Bibliografía.**

---

- ADELMON, D.D. and TABIDIAN, M.A.** 1996 The potential impact of soil carbon content on groundwater nitrate contamination. *Water Science Technology*. **33**: 227-232.
- AESØY, A. and ØDEGAARD, H.** 1993 Denitrification in biofilms with biologically hydrolysed sludge as carbon source. *Second International Specialized Conference on Biofilm Reactors*. Paris. pp 143-150.
- AFCHARION, A.; LEVI, Y. KIENE, L. and SCRIBE, P.** 1997 Fractionation of dissolved organic matter from surface waters using macroporous resins. *Water Research* **31**: 2989-2996
- AKUNNA, J.C.; BICEAU, C. and MOLETTA, R.** 1993 Nitrate and nitrite reduction with anaerobic sludge using various carbon sources: glucose, glycerol, acetic acid, lactic acid and methanol. *Water Research*. **27**: 1303-1312.
- ALEXANDRA, M.; O'CONNOR, A. and KOSSON, D.S.** 1994 Metabolims of aniline under different anaerobic electron-accepting and nutritional conditions. *Environmental Txicology and Chemistry*. **13**: 233-239.
- ALMEIDA, J.S.; REIS, M.A.M. and CARRONDO, J.T.** 1995 Competition between Nitrate and Nitrite Reduction in Denitrification by *Pseudomonas fluorescens*. *Biotechnology and Bioengineering*, **46**: 476-484.
- Anon.** 1984 Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology 9 th ed. Willians and Wilkins. Baltimore.
- Anon.** 1992 Carta del agua del Consejo de Europa, proclamada en Estrasburgo el 6 de mayo de 1968. En Legislación del medio ambiente pp 147-151. *Ed Tecnos*. Madrid.
- Anon.** 1995 Libro blanco de las aguas subterráneas. *Ministerio de Industria y Energía; Ministerio de Obras Públicas, Transportes y Medio Ambiente*. Madrid.
- AOI, T.; OKANIWA, Y; HAGIWARA, K.; MOTOMURA, K. IWAIHARA, E. IMAI, M. and SERIZAWA, Y.** 1992 A direct ammonium control system using fuzzy interference in a high-load biological denitrification process trating collected human excreta. *Water Science Technology*. **26**: 1325-1334.
- APHA, AWWA, WPCF** 1992. Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales. *Diaz de Santos*. Madrid.
- APPAN, A. and TING, D.S.** 1996 A laboratory study of sediment phosphorus flux in two tropical reservoirs. *Water Science Technology*. **34**: 45-52.

- ARAI, H.; IGARASHI, Y. and KODAMO, T.** 1991 Nitrite activates the transcription of the *Pseudomonas auruginosa* nitrite reductase and cytochrome c-551 operon under anaerobic conditions. *FEBS Letters*. **288**: 227-228.
- ARAKI, N. and HARADA, H.** 1993 Population dynamics of methanogenic biofilm consortium during a start-up period of anaerobic fluidized bed reactor. *Second International Specialized Conference on Biofilm Reactor*. Paris. pp 455-462.
- ARCANGELIS, J.P. and ARVIN, E.** 1993 Kinetics of toluene degradation in a biofilm system under denitrifying conditions. *Second International Specialized Conference on Biofilm Reactor*. Paris. pp 487-494.
- ASPEGREN, H. ; HELLSTRÖM, B.G. and OLSON, G.** 1997 The urban water system a future swedish perspective. *Water Science Technology*. **35**: 33-43.
- BONIN, P. and GILEWICZ, M.** 1991 Demonstration of "co-respiration" of oxygen and nitrogen oxides by *Pseudomonas nautica*: some spectral and kinetic properties of the respiratory components *FEMS Microbiology Letters* **80**: 183-188.
- BARRITT, N.W.** 1931 The liberation of elementary nitrogen by bacteria. *Biochemical Journal* **25**: 1965-1972.
- BEAUBIEN, A.; HU, Y. BELLAHCEN, D.; URBAIN, V. and CHANG, J.** 1995 Monitoring metabolic activity of denitrification processes using gas production measurements. *Water Research*. **29**: 2269-2274.
- BEDMAR, E.J.** 1992 Fisiología de la fijación de nitrógeno en nódulos radicales, En *Interacción Planta-Microorganismo: Biología del nitrógeno*, ed González-López, J. y Lluch Plá, C. pp 163-181. *Editorial Rueda*. Madrid.
- BEER, D. and STOODLEY, P.** 1995. Relation between the structure of anaerobic biofilm and transport phenomena. *Water Science Technology* **32**: 11-18.
- BEIJERINCK, M.W.** 1904 Phenomenes de reduction produits par les microbes. *Arch. Neerl. Sci. Exactes Nat.* **9**: 131-157.
- BENGTSSON, G. and BERGWALL, C.** 1995. Heterotrophic denitrification potential as an adaptive response in groundwater bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* **16**: 307-318.
- BERNET, N.; BIXEAU, C.; MOLETTA, R.; CORNIER, J.C. and DEGUIN, A.** 1995 Study of physicochemical factors controlling nitrite build-up during heterotrophic denitrification. *Environmental Technology*. **16**: 165-172.

- BETLACH, M.R. and TIEDJE, J.M.** 1981 Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide and nitrous oxide during bacterial denitrification. *Applied and Environmental Microbiology*. **42**: 1074-1084.
- BISHOP, P.E.; PREMAKUMAR, R.; JOEGER, R.D.; JACOBSON, M.R.; DALTON, D.A.; CHISNELL, J.R. and WOLFINGER, E.D.** 1988. Alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii* En *Proceeding of the 7th International Congress on Nitrogen Fixation* ed. Bothe, H.; de Bruijn, F.J. y Newton, W.J. pp 71-79. Stugart.
- BISHOP, P.L.; ZHANG, T.C. and FU, Y.C.** 1995. Effects of biofilm structure, microbial distributions and mass transport on biodegradation processes. *Water Science Technology* **31**: 143-152.
- BISHOP, P.L.** 1996. Biofilm structure and kinetics. *3<sup>er</sup> International IAWQ Special Conference on Biofilm Systems*. Copenhagen.
- BITTON, G.** 1994. Wastewater Microbiology. *Wiley-Liss*. New York.
- BLASZCZYK, M.** 1993 Effect of medium composition on the denitrification of nitrate by *Paracoccus denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**: 3951-3953.
- B.O.E.** 1990 Reglamento Técnico-Sanitario para abastecimiento y control de calidad de las aguas potables de consumo público. Real Decreto 1138/1990 de 14 de septiembre. Madrid.
- BOEHLER, E.; HALDENWANG, L. and SCHWABE, G.** 1993 Results and experience with the nebio tube reactor process in the water treatment plant sowing near Dresden. *Second International Specialized Conference on Biofilm Reactors*. Paris. pp 593-604.
- BOLLER, M.; GUJER, W. and TSCHUI, M.** 1994. Parameters affecting nitrifying biofilm reactors. *Water Science Technology* **29**: 1-11.
- BONIN, P. and GILEWICZ, M.** 1991 Demonstration of "co-respiration" of oxygen and nitrogen oxides by *Pseudomonas nautica*: some spectral and kinetic properties of the respiratory components *FEMS Microbiology Letters* **80**: 183-188.
- BRAIDE, J.O. and TRATTNER, R.** 1997 The role of agriculture in environmental pollution. In *Ecological issues and environmental impact assessment* (Cheremisinoff, P.N. ed.). Gulf Publishing Company, Houston.
- BRAUN, C. and ZUMFT, W.G.** 1992. The structural genes of the nitric oxide reductase complex from *Pseudomonas stutzeri* are part of a 30-kilobase gene cluster for denitrification. *Journal of Bacteriology* **174**: 2394-2397.

- BREMMER, J.M. and SHOW, K.** 1958. Denitrification in soil II. Factors affecting denitrification. *Journal Agricultural soil* **51**: 40-52.
- BRIERLEY, S.J.** 1985 The effects of artificial mixing on phytoplakton growth and periodicity. *Ph. D. thesis, University of Leicester.*
- BROCK, T.D. and MADIGAN, M.T.** 1991 Biology of microorganisms (6<sup>th</sup> ed). Prentice-Hall, Englewood. Cliffs, NJ.
- BRODISCH, K.E.V. and JOYNER, S.J.** 1983 The role of microorganisms in biological phosphate removal. *Water Science Technology*. **15**: 89-97.
- CALDWELL, D.E. and COSTERTON, J.W.** 1996 Are bacterial biofilms constrained to Darwin's concept of evolution through natural selection. *Microbiología*. **12**: 347-358.
- CASTIGNETTI, D. and HALLOCHER, T.C.** 1982 Nitrogen redox metabolims of a heterotrophic nitrifying-denitrifying *Alcaligenes* sp from soil. *Applied and Environmental Microbiology* **44**: 923-928.
- ÇEÇEN, F. and GÖENC, LE.** 1992 Nitrification-denitrification of high strength nitrogen wastes in two up-flow submerged filters. *Water Science Technology*. **26**: 2225-2228.
- CEDEX**, 1994 Curso sobre tratamiento de aguas residuales y explotación de estaciones depuradoras. M.O.P.T.M.A. Madrid.
- CERVANTES, E. y RODRÍGUEZ-BARRUECO, C.** 1992 Simbiosis en plantas no leguminosas de interés agronómico, En *Interacción Planta-Microorganismo:Biología del nitrógeno*, ed González-López, J. y Lluch Plá, C. pp 163-181. *Editorial Rueda*. Madrid.
- CLAY, D.E. ; CLAY, S.A.; MOORMAN, T.B.; BRIX-DAVIS, K.; SCHOLE, K.A. and BENDER, A.R.** 1996 Temporal variability of organic C and nitrate in shallow aquifer. *Water Research*. **30**: 559-568.
- COFMAN-ANDERSON, I. and LEVINE, J.S.** 1986 Relative rates of nitric oxide and nitrous oxide production by nitrifiers, denitrifiers and nitrate respirers. *Applied and Environmental Microbiology*. **51**: 938-945.
- COLLINS, R. and JENKINS, A.** 1996 The impact of agricultural land use on stream chemistry in the middle hills of the Himalayas, Nepal. *Journal of Hydrology* **185**: 71-86
- COMLY, H.H.** 1945 Cyanosis in infants caused by nitrates in well water. *Journal American Medical Assessment*. **129-2**: 112-116.

- CONSTANTIN, H. and FICK, M.** 1997. Influence of C-source on the denitrification rate of a high-nitrate concentrated industrial wastewater. *Water Research* **31**: 583-589.
- CORNBLATH, M. and HARTMANN, A.F.** 1948 Metahomoglobinemia in young infants. *Journal Paediatrics* **33**: 421-425.
- COYNE, M.S.; ARUNAKUMARI, A.; AVERILL, B.A. and TIEDJE, J.M.** 1989 Immunological identification and distribution of dissimilatory heme cd<sub>1</sub> and nonheme copper nitrite reductases in denitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 2924-2931.
- COYNE, M.S. and TIEDJE, J.M.** 1990 Induction of denitrifying enzymes in oxygen-limited *Achromobacter cycloclastes* continuous culture. *FEMS Microbiology Ecology*. **73**: 263-270.
- CUSTODIO, E.** 1981 Contaminación de las aguas subterráneas en relación con los vertidos de basuras urbanas de Barcelona. Actas de las jornadas de Análisis de Evaluación de la Contaminación de Aguas Subterráneas. España, Barcelona **1**: 225-247.
- CUSTODIO, E. y LLAMAS, M.R.** 1976 Hidrología subterránea. Ed Omega. Barcelona 2359pp.
- CUYPERS, H. and ZUMFT, W.G.** 1993. Identification and mutagenesis of the *fir* homology of *Ps stutzeri* (V114). *Bioengineering* **9**: 21.
- CHAMBON, P.; COIN, L. and VIAL, J.** 1983 Risque pour la Santé Humaine de certains composés azotés présents normalement ou éventuellement dans l'eau de boisson: les nitrates, nitrites et composés N-nitroso (2<sup>o</sup> partie). *Eau et L'Assainiss.* 440/441: 25-33.
- CHENG, K.C. and LIN, Y.F.** 1993 The relationship denitrifying and methanogenic bacteria in a mixed culture system of acclimated sludges. *Water Research*. **27**: 1749-1759.
- CHOW, V.T.; MAIDMENT, D.R. and MAYS, L.W.** 1994 Hidrología aplicada. *Mc Graw Hill Interamericana*. Colombia.
- CHRISTENSEN, B.E. and CHARACKLIS, W.G.** 1990 Physical and chemical properties of biofilms In *Biofilms* ed. Characklis, W.G. and Marshall, K.C. pp 93-130. *Wiley*. New York.
- CHRISTENSEN, S.** 1992 Decomposability of recalcitrant soil carbon assessed by denitrification. *FEMS Microbiology Ecology*. **82**: 267-274.
- DAHAB, M.F. and LEE, P.I.Y.** 1992 Nitrate reduction by in-situ biodenitrification in groundwater. *Water Science Technology*. **26**: 1493-1502.

- DALSGAARD, T.; ZWART, J; ROBERTSON, L.A.; KUENEN, J.G. and REUSBECH, N.P.** 1995 Nitrification, denitrification and growth in artificial Thiosphaera pantotropa biofilms as measured with combined microsensor for oxygen and nitrous oxide. *FEMS Microbiology Ecology* **17**: 137-148.
- DAVIDSON, E.A. and SWANK, W.T.** 1986 Environmental parameters regulating gaseous nitrogen losses from to forested ecosystem via nitrification and denitrification. *Applied and Environmental Microbiology*. **52**: 1287-1292.
- DAVIES, K.J.; LLOYD, D. and BODDY, L.** 1989 The effects of oxygen on denitrification in Paracoccus denitrificans and Pseudomonas aeruginosa. *Journal of General Microbiology*. **135**: 2445-2451.
- DAWSON, R.N. and MURPHY, K.L.** 1972. The temperature dependency of biological denitrification. *Water Research* **6**: 71-83.
- DEGRÉMONT** 1979. Manual Técnico del Agua, 4ª ed. *Degrémont*.
- DEHERAIN, P. P.** 1897 La reduction des nitrates dans la terre arable. C.R. Academy Sciences. **124**: 289-273.
- DEHERAIN, P. and MANQUENE, L.G.M.** 1997 La reduction des nitrates dans la terre arable. C.R. Acad Sci **124**: 269-273.
- DELAPORTE, B.** 1972 Trais nouvelles especes de Bacillus: Bacillus similibodius n. sp., Bacillus longisporus n sp., et Bacillus nitrotollens n. sp. *Annales de l' Institut Pasteur* **123**: 821-834.
- DÖBEREINER, J.** 1992 History and new perspectives of diazotrophs in association with non leguminous plants. *Symbiosis* **13**: 1-13
- D.O.C.E.** 1991 Directiva 91/271/C.E.E. relativa al tratamiento de aguas residuales urbanas.
- DOYLE, M.P.; HERMAN, J.G.; DYKSTRA, R.L.** 1985 Autocatalitic oxidation of hemoglobin induced by nitrite: Activation and chemical inhibition. *Journal Free Radical Biological Medical* **1**: 145-154
- DRTEL, M.; MÉMETH, P.; KUCMAN, K.; BODÍK, I. and KASPEREK, V.** 1995 Acidobasic balances in the course of heterotrophic denitrification. *Water Research*. **29**: 1353-1360.
- E.C.E.T.O.C.** 1988 Nitrate and drinking water. European Chemical Industry Ecology and Toxicology Center 165pp. Brussels

- EDINGTON, J.M. and EDINGTON, M.A.** 1986 Ecology, Recreation and Tourism. *Cambridge University Press*. Cambridge.
- EGERT, M.; HAMANN, A.; KÖMEM, R. and FRIEDRICH, C.G.** 1993 Methanol and Methyl amine utilization result from mutational event in *Thiosphaera pantotropa*. *Archives of Microbiology*. **159**: 364-371.
- ELKAN, G.H.** 1992 Taxonomy of the rhizobia. *Canadian Journal of Microbiology* **38**: 446-450
- EIKELBOOM, D.H. and van-BUIJSEN H.J.J.** 1981 Microscopic sludge investigation manual. *TNO Research Institute for Environmental Hygiene*. Delft, the Netherlands.
- ESPINOSA, R. ; MOLINA SANCHEZ, L. ; PULIDO BOSCH, A. NAVARRETE LÓPEZ, F.** 1996 Incidencia de la agricultura intensiva en el contenido de los nitratos en el agua del campo de Dalías: Evolución temporal y espacial. *Geogaceta*. **20**: 1281-1284.
- EYLOR, O.R. and SCHMIDT, E.L.** 1959 A survey of heterotrophic microorganisms from soil for ability to form nitrite and nitrate. *Journal of General Microbiology* **20**: 473-481.
- FERNÁNDEZ-POLANCO, F.; REAL, F.J. and GARCÍA, P.A.** 1993 Behaviour of an anaerobic-aerobic pilot scale fluidized bed for the simultaneous removal of carbon and nitrogen. *Second International Specialized Conference on Biofilm Reactors*. Paris. pp 445-454
- FLEMMING, H.C.** 1995 Sorption sites in biofilms. *Water Science Technology*. **32**: 27-35.
- FOCHT, D.D. and JOSEPH, H.** 1974 Degradation of 1,1-diphenylethylene by mixed cultures. *Canadian Journal of Microbiology* **20**: 631-635.
- FRIED, J.** 1985 Report for the Commission of the European Communities (European Institute for Water). Proc. *Workshop on Groundwater Protection Against Pollution by Nitrates*. Varese. 26-47
- FRITSCH, P.** 1982 Aspects métaboliques et toxicité alimentaire des nitrates et des nitrites. Tesis. Université de Toulouse III (Paul Sabatier).
- FRITSCH, P. y SAINT-BLANQUAT, G.** 1990 Nitratos, Nitritos y Nitrosaminas en *Toxicología y Seguridad de los alimentos* ed. Deroche, J. Editorial Omega. Barcelona.
- GALIL, N.** 1994. Comparative study evaluating removal mechanisms of hydrocarbons by fixed film versus suspended growth reactors. *Water Science Technology* **29**: 531-536.
- GANCZARCZYK, J.** 1996 Microbial film and Microbial flocs, some similarities and differences. *3<sup>th</sup> International Specialized Conference on Biofilm System*. Copenhagen.

- GARCÍA-ARÓSTEGUI, J.L.; CRUZ-SANJULIAN, J.; HIDALGO-ESTÉVEZ, M.C. y CARRASCO-CANTOS, F.** 1996 Deterioro de la calidad de las aguas subterráneas en el acuífero del río Vélez en el período 1985-1994 (Málaga, España). *Geogaceta*. **20**: 1277-1280.
- GARZÓN-ZUÑIGA, M.A. and GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.** 1996. Biological phosphate and nitrogen removal in a biofilm sequencing batch reactor. *Water Science Technology* **34**: 293-301.
- GAYAN, U. AND DUPETIT, G.** 1882 Sur la fermentation des nitrates. *C. R. Acad. Sci.* **95**: 644-646.
- GAYAN, U. AND DUPETIT, G.** 1886 Recherches sur la reduction des nitrates par les infimeints petit. *Mem. Soc. Sci. Phys. Nat. Bordeaux* **2**: 201-307.
- GERRITSE, R.G.; ADENEY, J.A. and HOSKING, J.** 1995 Nitrogen losses from a domestic septic tank system on the Darling plateau in western Australia. *Water Research*. **29**: 2055-2058.
- GHEEWALA, S.H. and ANNACHHLATR, A.P.** 1997 Biodegradation of aniline. *Water Science Technology*. **36**: 53-63.
- GHOSE, T.K. and BHADRA, A.** 1985 Acetic acid In *Comprehensive Biotechnology, The practice of biotechnology: Currents Commodity Products* pp 701-729. Pergamon Press. London.
- GRADE, J.A.; GONZALÉZ, A.; BELTRÁN, R. and SÁNCHEZ RODAS, D.** 1996. Application of factor analysis to the study of contamination in the aquifer system of Ayamonte-Huelva (Spain). *Groundwater*. **34**: 155-161.
- GRAS, H. and ALVAREZ, J.** 1991 Tratamiento biológico de aguas residuales urbanas por biofiltración sobre material granuloso y nitrificación sobre soporte sumergido. *Tecnología del agua*. **86**: 58-65.
- GRAHAM, P.H. and PARKER, C.A.** 1964 Diagnostics features in the characterization of the root-nodule bacteria of legumes. *Plant and Soil* **20**: 383-396.
- GUMAELIUS, L.; SMITH, E.H. and DALHAMMAR, G.** 1996 Potential biomarker for denitrification of wastewater: effects of process variables and cadmium toxicity. *Water Research*. **30**: 3025-3031.
- GUPTA, G.; SABARATNAM, S.; and DADSON, R.** 1986 A modified nitrogen oxide-ozone photolytic cycles. *Water Air and Soil Pollution*. **33**: 117-124.

- HAGEDORN-OLSEN, C.; MOLLER, I.H.; TOTTRUP, H. and HARREMOËS, P.** 1993 Oxygen reduces denitrification in biofilm reactors. *Second International Specialized Conference On Biofilm Reactors*. Paris. pp 133-141.
- HALLIN, S.; ROTHMAN, M. and PELL, M.** 1996 Adaptation of denitrifying bacteria to acetate and methanol in activated sludge. *Water Research*. **30**: 1445-1450.
- HAMILTON, P.A. and HELSEL, D.R.** 1995 Effects of agriculture on groundwater quality in five regions of the United States. *Groundwater*. **33**: 217-226.
- HARPER, D.** 1992. Eutrophication of freshwaters. *Chapman and Hall*. London.
- HARREMOËS, P.** 1978. Biofilm kinetics, En "*Water Pollution Microbiology*" Vol 2 pp 71-109. ed. Mitchel, R. Willey, New York.
- HAYES, C.R. and GREENE, L.A.** 1984 The evaluation of eutrophication impact in public water supply reservoirs in East Anglia. *Water Pollution Control*. **83**: 42-51
- HENRY, Y.; DUCROCQ, C.; DROPIER, J.C.; SERVENT, D.; PELLAT, C. and GUISSANI, A.** 1991 Nitric oxide, o biological effector. Electron paramagnetic resonance detection of nitrosyl-iron-protein complexes in whole cells. *European Biophysic Journal*. **20**: 1-5.
- HERNÁNDEZ-MUÑOZ, A.** 1990 Depuración de aguas residuales. *Colegio de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos*. Madrid.
- HIJNEN, W.A.M.; VOOGT, R.; VEENENDAAL, H.R.; JAGT, H. and KOOIJ, D.** 1995 Bromate Reduction by Denitrifying Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 239-244
- HIRATA, A. and MEUTIN, A.A.** 1996. Denitrification of nitrite in two phase fluidized bed bioreactor. *Water Science Technology* **34**: 339-346.
- HONTORIA, E.; BACQUET, G. and SALGUERO, J.** 1993. Groundwater denitrification with biofilm reactors. A case study in Spain. *Second International Specialized Conference on Biofilm Reactors*. Paris. pp 695-696.
- HUTCHINS, S.R.** 1993 Biotransformation and mineralization of alkylbenzenes under denitrifying conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **12**: 1413-1423.
- HUTCHINSON, G.E.** 1973 Eutrophication. *American Scientist* **61**: 269-279.
- HUTZINGER, O.** 1982 Tha natural environment and the biogeo-chemical cycles. *Ed. Springer-Verlaes*. Berlín. 317 pp.

- I.T.G.M.E.** 1989 Contaminación de las aguas subterráneas. La problemática de los nitratos y su incidencia en España.
- JAFFE, E.R.** 1981 Clinics in Haematology. **10**: 99-122.
- JAHN, A. and NIELSEN, P.H.** 1995 Extraction of extracellular polymeric Substances (EPS) from biofilms using a cation exchange resin. *IAWQ International Conference and Workshop on Biofilm Structure Growth and Dynamics. Noordwijkerhout, the Netherland.*
- JAHN, A.; NIELSEN, P.H. and PALMGREM, R.** 1996 Differences in biofilm structure and composition in response to oxygen and carbon limitation. *3<sup>th</sup> Specialized Conference on Biofilm System.* Copenhagen.
- JANNING, K.F.; HARREMÖES, P. and NIELSEN** 1995 Evaluating and modelling the kinetics in a full scale submerged denitrification filter. *Water Science Technology.* **32**: 115-123.
- JANSEN, C.J.; JEPSEN, S.E. and LAURSEN, K.D.** 1994. Carbon utilization in denitrifying biofilter. *Water Science Technology* **29**: 101-109.
- JETER, R.M. and INGRAHAM, J.L.** 1981 The denitrifying prokaryotes In *The Prokaryotes* (Ed Starr, M.P.; Stolp, H.; Truper, H.G.; Balows, A. and Schlegel, H.G.). pp 913-925. Springer. Berlin.
- JOHANSSON, C. and GALBALLY, I.E.** 1984 Production of nitric oxide in loam under aerobic an anaerobic conditions. *Applied and Enviromental Microbiology.* **47**: 1284-1289.
- JOHN, P.** 1977. Aerobic and anaerobic bacterial respiration monitored by electrodes. *Journal of General Microbiology.* **98**: 231-238.
- JÓNASSON, P.** 1969 Botton fauna and eutrophication, In *Eutrophication: Causes, Consequences, Correctives* ed. Rohlich, G.A. pp 274-305 *National Academy of Science.* Washington D.C.
- KANG, S.J.; BAILEY, W.F. and JENKINS, D.** 1992 Biological nutrient removal at the blue plains wastewater treatment plant in Washington, D.C. *Water Science Technology.* **26**: 2233-2236.
- KARPUZCU, M.; BUKTEL, D and AYDIN, Z.S.** 1996 The dewaterability, heavy metal release and reuse characteristics of Golden Horn surface sediment. *Water Science Technology.* **34**: 365-374.
- KAVANAUGH, R.G. and RANDALL, C.W.** 1994 Bacterial populations in a biological nutrient removal plant. *Water Science technology.* **29**: 25-34.

- KEENEY, D.R.; FILLERY, I.R. and MARX, G.P.** 1979. Effects of temperature on the gaseous nitrogen products of denitrification in a silt loam soil. *Soil Science Society American Journal* **43**: 1124-1128.
- KLAASSEN, C.; AMDUR, M.O. and DAULL, J.** 1986. Toxicology, the basic science of poisons 3<sup>a</sup> ed. MacMillan Publishing Company, New York.
- KNAPPERT, P.L.; OSKAM, G.** 1987 Situation der öffentlichen wasserversorgung in den EG-Mitgliedstaaten aus der sicht der wassergüte. Proc. *Europäische Konferenz. Einflüsse der Land-Wirtschaft auf die Wasserressourcen Folgen und Zukünftige Entwicklungen*. Berlin.
- KNOWLESS, R.** 1982 Denitrification. *Microbiological Review* **46**: 43-70
- KOLPIN, D.W. and GOOLSBY, D.A.** 1995 A regional monitoring network to investigate the occurrence of agricultural chemicals in near-surface aquifers of the midcontinental USA. *Groundwater Quality: Remediation and Protection*. **225**: 13-20.
- KÖRNER, H. and ZUMFT, W.G.** 1989 Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*. *Applied and Environmental Microbiology*. **55**: 1670-1676.
- KÖRNER, H. and MAYER, F.** 1992 Periplasmic location of nitrous oxide reductase and its apoform in denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. *Archives of Microbiology*. **157**: 218-222.
- KÖRNER, H.** 1993 Anaerobic expression of nitric oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. *Archives of Microbiology*. **159**: 410-416.
- KOSKINEN, W.C. and KEENEY, D.R.** 1982. Effect of the pH on the rate of gaseous products of denitrification in a silt loam soil. *Soil Science Society American Journal*. **46**: 1165-1167.
- LACAMP, B.; HANSEN, F.; PENILLARD, P. and ROGALLA, F.** 1993. Wastewater nutrient removal with advanced biofilm reactors. *Water Science Technology* **27**: 263-276.
- LAZAROVA, V.Z.; CAPDEVILLE, B. and NIKOLOV, L.** 1992. Biofilm performance of a fluidized bed biofilm reactor for drinking water denitrification. *Water Science Technology* **26**: 555-566.
- LAZAROVA, V.Z.; CAPDEVILLE, B. and NIKOLOV, L.** 1994. Influence of seeding conditions on nitrite accumulation in a denitrifying fluidized bed reactor. *Water Research*. **28**: 1189-1197.

- LAZAROVA, V.; PIERZO, V.; FONTVIELLE, D and MANEM, J.** 1994 Integrated Approach for Biofilm Characterisation and Biomass Activity Control. *Water Science and Technology* **29**: 345-354.
- LAZAROVA, V. and MANEM, J.** 1995 Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Research*. **29**: 2227-2245.
- LEBEDEFF, A.J.** 1909 Über die assimilation des kohlenstoffes bei wassertoffox y dieremden bakterien. *Ber. Dent. Boton. Ges.* **27**: 598-602.
- LEMILLE, F.; de BARJOR, H. and BONEFORI, A.** 1969 Essai sur la classification biochimique de 97 bacillus du group I, appartenant a 9 especes differentes. *Annales de l' Institut Pasteur* **116**: 808-819.
- LEMMER, H.; ROTH, D. and SCHADE, M.** 1994 Population density and enzyme activities of heterotrophic bacteria in sewer biofilm and activated sludge. *Water Research*. **28**: 1341-1346.
- LEWANDOWSKI, Z.; STOODLEY, P. and ALTOBELLI, S.** 1995 Flow induced vibration, drag forces and pressure drop in conduits covered with biofilm. *Water Science Technology*. **32**: 19-26.
- LIERH, S.K.; CHEN, H.J. and LIN, S.H.** 1994 Metals removal by algal biofilm. *Water Science Technology* **34**: 59-68.
- LOHSE, L.; KLOOSTERHUIS, H.T.; van RAAPHORST, W. and HELDER, W.** 1996 Denitrification rates as measured by the isotope pairing method and by the acetylene inhibition technique in continental shelf sediments of the North Sea. *Marine Ecology Progress Series*. **132**: 169-179.
- LOOSDRECHT, M.C.M.; EIKELBOOM, D.; GJALTEMA, A.; MULDER, A.; TIJHUIS, L. and HEIJNEN, J.J.** 1995. Biofilm structures. *Water Science Technology* **32**: 35-43.
- LÓPEZ-VERA, F.** 1982 Nitrate pollution in Madrid tertiary basin. Proc. 16 th Congress of I.A.H. Prague. 237-247.
- LLOYD, J.W. and HEATHCATE, J.A.** 1985 Natural inorganic hydrochemistry in relation to groundwater. Clarendon Press. Oxford pp 459.
- MARGALIS, L. and LOVELOCK, J.E.** 1974 Biological modulation of the earth's atmosphere. *Icarus* **21**: 471-489.

- MARTÍNEZ-MOLINA, E. y VELAZQUEZ, E.** 1992 Organismos fijadores de nitrógeno atmosférico, En *Interacción Planta-Microorganismo: Biología del nitrógeno*, ed González-López, J. y Lluch Plá, C. pp 163-181. *Editorial Rueda*. Madrid.
- MARTÍNEZ-TOLEDO, M.V.** 1992 Biología del nitrógeno, en *Interacción planta microorganismo: Biología del nitrógeno* pp 26-35 (González-López, J. y Lluch- Pla, C. eds) *Editorial Rueda*, Alcorcón Madrid.
- MARTÍNEZ TOLEDO, M.V.; GÓMEZ, M.A.; CALVO, C.; LÓPEZ, L. and GONZÁLEZ-LÓPEZ, J.** 1996. Microbiological aspects of nitrification and denitrification in seven protected wetland in the area of Antequera (Spain). In *Wetland: A multiapproach perspective* (Cruz-SanJulian, J. and Benavente, J.). University of Granada.
- MATSUBARA, T.** 1975 The participation of cytochromes in the reduction of  $N_2O$  to  $N_2$  by a denitrifying bacteria. *Journal Biochemical*. 77: 627-632.
- Mc CARTY, P.L.; BECK, L. and AMANT, P.** 1969 Biological denitrification of wastewater by addition of organic material. *Proc 24<sup>th</sup>Inds. Waste Conference*. Pardac University, Lafayette, Ind. USA.
- Mc FADDIN, J.F.** 1976. Bichemical test for identification of medical bacteria. *Willians and Wilkins*. Baltimore.
- Mc KENNEY, D.J.; JOHNSON, G.P. and FINDLAY, W.I.** 1984 Effect of temperature on consecutive denitrification reactions in brookston clay and fox sandy loam. *Applied and Environmental Microbiology*. 47: 919-926.
- Mc NALL, E.G. and ATKINSON, D.E.** 1956 Nitrate reduction: Growth of *Escherichia coli* with nitrate as sole source of nitrogen. *Journal Bacteriology*. 17: 226-229.
- Mc NALL, E.G. and ATKINSON, D.E.** 1957 Nitrate reduction: Utilization of possible intermediates as nitrogen source and as electron acceptors. *Journal Bacteriology*. 74: 60-66.
- MEANEY, B.J. and STRICKLAND, J.E.T.** 1993. Operating experiences with sumerged filters for nitrification and denitrification. *Second international specialized conference on biofilm reactors*. París pp 171-178.
- METCALF and EDDY** 1991 *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal and Reuse* (3<sup>ed</sup>) Mc Graw Hill, New York.
- MEUSEL, E.** 1876 De la putrefaction produite por les bacteries en presence des nitrates alcalins. *Ann. Chim. Phys.* 7: 287-288.

- MIRVISH, S.S.** 1977 Toxicology Applied Pharmacology. **31**: 325-331.
- MURRAY, R.G.E. ed.** 1981 Manual of Methods for General Microbiology. *American Society For Microbiology*, Washington, D.C.
- NÄGELE, W. and CONRAD, R.** 1990 Influence of soil pH on the nitrate reducing microbial populations and their potential to reduce nitrate to NO and N<sub>2</sub>O. *FEMS Microbiology and Ecology*. **74**: 49-58.
- NAMMIK, H.** 1956. Investigation on denitrification in soil. *Acta Agricultural Scandinavian* **6**: 195-228.
- NAUMANN, E.** 1919 Nagra synpunkte angående planktons okologi. Med. sarskilde hansyn till fytoplankton. *Svensk Botaniske Tidskrift*. **13**: 129-158.
- NEWTON, W.E.** 1993 Nitrogenases: distribution, composition, structure and function. En *New horizons in nitrogen fixation* ed. Palacios, R.: Mora, J. y Newton, W.E. pp 5-18. Kluwer Academy Publishers (Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture Vol. 17). Dordrecht.
- NGUYEN, T. and SHIEH, W.K.** 1995 Anoxic and oxic biological fluidized bed treatment of amines and phenol. *Water Science Technology*. **31**: 185-193.
- NURIZZO, C. and MENZZANOTTE, V.** 1992 Groundwater biodenitrification on sand fixed film reactor using sugar as organic carbon source. *Water Science Technology*. **26**: 827-834.
- NYBERG, U.; ASPEGREN, H.; ANDERSSON, B.; JANSEN, J.C. and VILLADSEN, I.S.** 1992 Full-scale application of nitrogen removal with methanol as carbon source. *Water Science Technology*. **26**: 827-834.
- ODOM, J.M.** 1990. Industrial and environmental concerns with sulfate reducing bacteria. *ASM News* **56**: 473-476.
- OENEMA, O. and VELTHOF, G.L.** 1993 Denitrification in nitric-acid-treated cattle slurry during storage. *Netherlands Journal of Agricultural Science*. **41**: 63-80.
- OHASHI, A.; VIRAJ de SILVA, D.G.; MOBARRY, B.; MANEM, J.A.; STAHL, D.A. and RITTMANN, B.E.** 1995 Influence of substrate C/N ratio on the structure of multi-species biofilms consisting of nitrifiers and heterotrophs. *Water Science Technology*. **32**: 75-84.

- OKABE, S.; HIRATA, K. and WATANABE, Y.** 1995 Dynamics changes in spatial microbial distribution in mixed-population biofilm: Experimental results and model simulation. *Water Science Technology*. **32**: 67-74.
- OOSTROM, A.J. and RUSSELL, J.M.** 1994 Denitrification in constructed wastewater wetlands receiving high concentration of nitrate. *Water Science Technology*. **29**: 7-14.
- OWEN, M.A.; O'CONNOR, A. and KOSSON, S.** 1994 Metabolism of aniline under diferent anaerobic electron-accepting and nutritinal conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **13**: 233-239.
- PALLERONI, N.J.; DOUDOROFF, M. and STAINER, R.Y.** 1970 Taxonomy of the aerobic pseudomonads: The propiertis of the *Pseudomonas stutzeri* group. *Journal of General Microbiology* **60**: 215-231.
- PAPEN, H.; VON BERG, R.; HINKEL, I.; THOENE, B. and RENNENBERG, H.** 1989 Heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis*: NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N<sub>2</sub>O and NO Production in exponentially growing cultures. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 2068-2072.
- PARKIN, T.B.; SEXSTONE, A.J. and TIEDJE, J.M.** 1985. Adaptation of denitrifying populations to low soil pH. *Applied and environmental Microbiology*. **49**: 1053-1056.
- PARKIN, T.B. and ROBINSON, J.A.** 1989 Stochastic models of soil denitrification. *Applied and Environmental Microbiology*. **55**: 72-77.
- PATUREAU, D.; DAVISON, J.; BERNET, N. and MOLETTA, R.** 1994 Denitrification under various aerations conditions in *Comamonas* sp. strain SGLY2. *FEMS Microbiology Ecology*. **14**: 71-78.
- PAUL, J.W.; BEAUCHAMP, E.G. and TREVOR, J.T.** 1989 Acetate propionate, butyrate, glucose and sucrose as carbon source for denitrifying bacteria in soil. *Canadian Journal Microbiology*. **35**: 754-759.
- PAVEL, E.W.; RENEAU Jr, R.B.; BERRY, D.F.; SMITH, E.P. and MOSTAGHIMI, S.** 1996 Denitrification potential of nontidal riparian wetland soil in Virginia coastal plain. *Water Research*. **30**: 2798-2804.
- PAYNE, W.J.** 1973 Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Bacterial Review*. **37**: 409-452.
- PAYNE, W.J.** 1981 Denitrification. Jonh Wiley and Sans Inc. U.S.A. 213 pp.

- PERCIVAL, S. L.; KNOPP, J. S.; EDYVEAN, R and WALES, D. S.** 1998 Biofilm development on stainless steel in mains water. *Water Research* **32**: 243-253.
- PETERSEN, S.O.; NIELSEN, T.H.; FROSTEGARD, A. and OLESEN, T.** 1996 O<sub>2</sub> uptake, C metabolism and denitrification associated with manure hot-spots. *Soil Biological Biochemistry*. **28**: 341-349.
- PEYTON, B.M.** 1996 Effects of shear stress and substrate loading rate on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm thickness and density. *Water Research*. **30**: 29-36.
- PFENNING, K.S. and Mc MAHON, P.B.** 1996 Effect of nitrate, organic carbon and temperature on potential denitrification rates in nitrate- rich riverbed sediments. *Journal of Hidrology*. **187**: 283-295.
- PHILIPOT, J.M.** 1982 Dénitrification des eaux de consommation. *T.S.M. L'eau* **69**: 27-33.
- PICHINOTY, F.; AZOULAY, E.; COUCHOUD-BEAUMONT, P.; Le MINOR, L.; RIGANO, C.; BIGLIARDI-RAUVIER, J. and PIECHAUD, M.** 1969 Recherche des nitrates-reductases bacteriennes A et B: Resultats. *Annales L'Institut Pasteur*. **116**: 27-42.
- PORTER, K. S.** 1980 An evaluation of sources of nitrogen as causes of groundwater contamination in Nassaw county, Long Island. *Groundwater* **18**: 617-625.
- POTH, M and FOCHT, D.D.** 1985 <sup>15</sup>N Kinetic analysis of N<sub>2</sub>O Production by *Nitrosomonas europaea*. An examination of nitrifier denitrification. *Applied and Environmental Microbiology* **49**: 1134-1141.
- POZO, C.; MARTÍNEZ-TOLEDO, M.V.; SALMERON, V.; RODELAS, B. and GONZÁLEZ-LÓPEZ, J.** 1995 Effect of chlorpyrifos on soil microbial activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **14**: 187-192.
- PRAKASAM, T.B.S. and LOEHR, R.C.** 1972. Microbial nitrification and denitrification in concentrated wastes. *Water Research* **6**: 859-869.
- PROBANZA, A.; GUTIERREZ-MAÑERO, F.J. ; RAMOS, B.; ACERO, N. and LUCAS. J.A.** 1996 Effect of heavy metals on soil denitrification and CO<sub>2</sub> production after short term incubation. *Microbiología*. **12**: 417-424.
- PURSCHEL, W.** 1976 Tratado general del agua y su distribución. *Urmo de ediciones* . Madrid.
- RAHMANI, H.; ROLS, J.L.; CAPDEVILLE, B.; CORNIER, J.C. and DEGUIN, A.** 1995 Nitrite removal by a fixed culture in a submerged granular biofilter. *Water Research*. **29**: 1745-1753.

- RAMOS, C.** 1987 The use of the chlorine balance method for estimating nitrate leaching. Proc. CEC Seminar on Nitrogen Efficiency in Agricultural Soil on the efficient use of fertiliser nitrogen. Edinburgh.
- RANDALL, C.W.; BARNARD, J.L. and STENSEL, H.D.** 1992 Desing and retrofit of wastewater treatment plant for biological nutrient removal. Technomic Lancaster. Basel.
- REGIER, H.A. and HARTMANN, W.L.** 1973 Lake Erie's fish community: 150 years of cultural stress. *Science*, **180**: 1248-1255.
- REISET, J.** 1868 Note sur la production du gaz nitreux pendant la marche des fermentations dans les distilleries. Dosage des proportions d'ammoniaque continues dans le jus de la betterane. *C.R. Acad. Sci.* **66**: 237-239.
- REMDE, A. and CONRAD, R.** 1990 Metabolism of nitric oxide in soil and denitrifying bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*. **85**: 81-94.
- REMOCLE, J.** 1977 Microbial Transformation of nitrogen in forests. *Oecol Planatarium* **7**: 69-78.
- RICE, J.A. and VISTE, D.A.** 1994 Mayor sources of groundwater contamination: Assessing the extent of point and nonpoint contamination in a shallow aquifer system In Groundwater Contamination and Control pp 21-35 (Ed Zoller, V.) *Marcel Dekker Inc.* New York.
- RICHARDS, S.R. and KNOWLES, R.** 1995 Inhibition of nitrous oxide reduction by a component of Hamilton Harbour sediment. *FEMS Microbiology Ecology*. **17**: 39-46.
- RICHARD, Y. and PARTOS, J.** 1986 Elimination biologique des nitrates en vie de la production d'eau potable: bilan de fonctionnement de deux installation industrielles. *T.S.M. l'eau*. **3**: 141-147.
- RIETHUES, M.; BUCHHOLTZ, R.; ONKEN, O.; BAUMGARTL, H. and LUBBERS, D.W.** 1986 Determination of oxygen transfer from single air bubbles to liquids by oxygen microelectrodes. *Chemical Engineering Process*. **20**: 332-337.
- ROBERSON, E.B. and FIRESTONE, M.K.** 1992 Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**: 1284-1291.
- ROBERTSON, L.A.; VAN NIEL, E.W.J.; TORRESMONS, R.A.M. and KUENEN, J.G.** 1988 Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha*. *Applied and Environmental Microbiology* **54**: 2812-2818

- ROE and PAPADOPOULOS** 1954. *Journal Biological Chemistry* **210**: 703.
- RODINA, A.G.** 1972 *Methods in aquatics microbiology. University Park Press* Baltimore.
- ROGALLA, F.; BADARD, M.; HANSEN, F. and DANSHOLM, P.** 1992. Upscaling a compact nitrogen removal process. *Water Science Technology*. **26**: 1067-1076.
- ROGALLA, F.; RAVARINI, P. De LARMINAT, G. and COUTELLE, J.** 1990 Large-scale biological nitrate and ammonia removal. *Journal IWEM*. **4**: 319-329.
- ROHMAN, V. y SANTHEIRMER, H.** 1985 Nitrat im grundwasser. Ursachen, Bedeutung. Lösungswege. DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut der Universität Karlsruhe. Karlsruhe. 451 pp
- ROSEN, M. and WELANDER, T.** 1994 Microbiology of an anoxic trickling filter. *Water Science Technology*. **29**: 381-383.
- RYSGVARD, S.; RYSGAARD-PETERSEN, N.; NIELSEN, L.P. and REVSBECH, N.P.** 1993 Nitrification and denitrification in lake and estuarine sediments measured by the <sup>15</sup>N dilution technique and isotope pairing. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**: 2093-2098.
- SAMRAKANDI, M.M.; ROQUES, C. and MICHEL, G.** 1997 Influence of trophic conditions on exapoly saccharide production: bacterial biofilm susceptibility to chlorine and monochloramine. *Canadian Journal of Microbiology*. **43**: 751-758.
- SANCHEZ DE MEDINA, F.; SANCHEZ, A. Y SUAREZ, M.D.** 1992. Introducción a la bioquímica clínica. Apuntes de bioquímica especial. Universidad de Granada.
- SANCHIS-MOLL, E.J.** 1990 Estudio de la contaminación por nitrato de las aguas subterráneas de la provincia de Valencia. Origen, balance y evolución espacial y temporal. Diputación Provincial de Valencia.
- SANCHIZ, E.J.** 1990 Estudio de la contaminación por nitratos de las aguas subterráneas de la provincia de Valencia. Origen, Balance y Evolución espacial y temporal. Diputación Provincial de Valencia.
- SCHALZ, M. and MARTIN R.J.** 1997 Ecological equilibrium on biological activated carbon. *Water Research*. **31**: 2959-2958.
- SCHLOESING, T.** 1968 Sur la descomposition des nitrates pendant les fermentations. *C.R. Acad. Sci.* **66**: 237-288.

- SCHNEIDEWIND** 1897 Die umsetzungen der verschieden stickstoffformen in staeldunger. *Z.Acker. Pflanzenbau* **45**: 173-202
- SHAPIRO, J.** 1990 Current beliefs regarding dominance by blue-greens: the case for the importance of CO<sub>2</sub> and pH. *Verhandlungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* **Vol 24**.
- SHAPLEIGH, J.P. and PAYNE, W.J.** 1985 Nitric oxide dependent proton translocation in various denitrifiers. *Journal of Bacteriology*. **163**: 837-840.
- SHENG, H.L. and CHANG, L.W.** 1996 Removal of nitrogenous compounds from aqueous solution by ozonation and ion exchange. *Water Research*. **30**: 1851-1857.
- SISON, N.F.; HANAKI, K. and MATSOU, T.** 1996 Denitrification with external carbon source utilizing adsorption and desorption capability of activated carbon. *Water Research*. **30**: 217-227.
- SMITH, R.A.** 1867 On the examination of water for organic matter. Manchester. *Let. Philas. Soc. Mem. Ser.* **4**: 37-88
- SOBSEY, M.D. and OLSON** 1983. Microbial agents of waterborne disease. En "*Assessment of microbiology and turbidity standards for drinking water*" ed. Berger, P.S. and Argamon, T., pp EPA, office of drinking water, Washington, D.C.
- SORENSEN, J.** 1978 Denitrification rates in a marine sediment as measured by the acetylene inhibition technique. *Applied and Environmental Microbiology*. **36**: 139-143.
- SPIRO, S. and GUEST, J.R.** 1990 FNR and its role in oxygen regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Review*. **75**: 399-428.
- SPRENT, J.L.; SUTHERLAND, J.M. y DE FARIA, S.M.** 1987 Some aspects of the biology of nitrogen-fixing organisms. En *A Century of Nitrogen Fixation Research: Present Status and Future Prospects (Proceeding of a Royal Society Discussion Meeting 2-23 October 1986)* ed. Bergensen ,F.J. y Postgate, J.R. pp 45-63. The Royal Society (Cambridge University Press). London.
- STANIER, R.Y.; INGRAHAM, J.L.; WHEELIS, M.L. and PAINTER, P.R.** 1988 *Microbiología* 2<sup>a</sup> ed. Reverté. Barcelona. 750 pp.
- TAKASAKI, M.; KIM, H.; SATO, A.; OKADA, M. and SUDO, R.** 1989. Submerged biofilm process as a pre-treatment of polluted raw water for tap water supply. *Technical advances in biofilm reactors*. Nice pp 157-168.

- TAKASAKI, M.; SUDO, R.; NISHIMURA, O. and KIM, H.Y.** 1992 Simultaneous removal of nitrogen and THM precursor by developed submerged biofilm process for drinking water. *Water Science Technology*. **26**: 2021-2024.
- THAUER, R.K.; JUNGEMANN, K. and DECKER, K.** 1977 Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews* **41**: 100-180.
- THOMAS, A.E.** 1969. The process of eutrophication in central European lakes, in Eutrophication: Causes, Consequences, Correctives (ed G.A. Rohlich), *National Academy of Sciences*, Washington D.C. pp 17-28.
- THOMAS, K.L.; LLOYD, D. and BODDY, L.** 1994 Effects of oxygen, pH and nitrate concentration on denitrification by Pseudomonas species. *FEMS Microbiology Letters*. **118**: 181-186.
- THOMSEN, J.K.; GEEST, T. and COX, R.P.** 1994 Mass spectrometric studies of the effect of pH on the accumulation of intermediates in denitrification by Paracoccus denitrificans. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**: 536-541.
- THÖRN, M.; MATTSSON, A. and SÖRENSSON, F.** 1996. Biofilm development in a nitrifying trickling filter. *Water Science Technology* **34**: 83-90.
- THÖRN, M. and SÖRENSSON, F.** 1996 Variation of nitrous oxide formation in the denitrification basin in a wastewater treatment plant with nitrogen removal. *Water research*. **30**: 1543-1547.
- TIEDJE, J.M.** 1978 Denitrification in soil. In Microbiology (Schelessinger, D. ed.) pp 362-366. ASM Publications. Washington.
- TIEDJE, J.M.** 1982 Denitrification. In Methods of Soil Analysis Part 2. Chemical and Microbiological Properties (Page, A.L. et al, Eds.). pp 1018-1019. Agronomy Monograph No.9 2nd edition. American Society of Agronomy. Madison.
- UNESCO** 1978 Studies and Reports in Hydrology. *National Committee for the International Hydrological Decade, world water balance and water resources of the earth*. Vol 25. Paris
- VINER, A.B.** 1975. The supply of minerals to tropical lakes and rivers (Uganda) in Coupling of Land and Water Systems (ed A.D. Hasler), *Springer-Verlag*, Berlin.
- VÖLKL, P.; HUBER, R.; DROBNER, E.; RACHEL, R.; BURGGRAF, S.; TRINCONE, A. and STETTER, K.O.** 1993 Pyrobaculum aerophilum sp. nov., a novel nitrate reducing hyperthermophilic archaeum. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**: 2918-2926.

- VOLOKITA, M.; BELKIN, S.; ABELIOVICH, A. and SOARES, M.M.M.** 1996 Biological denitrification of drinking water using newspaper. *Water Research*. **30**: 965-971.
- WARINGTON, R.** 1897 Denitrification and farmyard manure. *J. R. Agric. Soc. Eng.* **8**: 577-607.
- WEEG-AERSEN, E. ; WU, W.; YE, R.W.; TIEDJE, J.M. and CHANG, C.K.** 1991 Purification of cytochrome cd<sub>1</sub> nitrate reductase from *Pseudomonas stutzeri* JM 300 and reconstitution with native and synthetic heme d<sub>1</sub>. *Journal Biological Chemistry*. **266**: 7496-7502.
- W.H.O.** 1985 Health hazards from nitrates in drinking water. Report on W.H.O. meeting of Copenhagen.
- WILLEMS, H.P.; ROTELLI, M.D.; BERRY, D.F.; SMITH, E.P.; RENCAU, R.B. and MASTAGHIMI, S.** 1997. Nitrate removal in riparian wetland soil: effects of flow rate, temperature, nitrate concentration and soil depth. *Water Research* **31**: 841-849.
- WIMPENNG, J.W.T. and CALASAUTI, R.** 1997. A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models. **22**: 1-16.
- WOOD, P.M.** 1986 Nitrification as a bacterial energy source. In Nitrification (Prosser, J.I. ed) Society Of General Microbiology. Oxford.
- WORTHINGTON, P.** 1987 A movement towards community measures for the protection of freshwater against pollution from diffuse sources of nitrogen compounds. Proc. *Europäische Konferenz. Einflüsse der Landwirtschaft auf die Wasserressourcen Folgen und zukünftige Entwicklungen*. Berlin.
- XU, B. and ENFORS, S.O.** 1996 Influence of nitrate starvation on nitrite accumulation during denitrification by *Pseudomonas stutzeri*. *Applied Microbiology Biotechnology*. **45**: 229-235.
- YE, R.W.; FRIES, M.R.; BEZBORODNIKOV, S.G.; AVERILL, B.A. and TIEDJE, J.M.** 1993 Characterization of the structural gene encoding a copper-containing nitrite reductase and homology of this gene to DNA of other denitrifiers. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**: 250-254.
- YE, R.W.; AVERILL, B.A. and TIEDJE, J.M.** 1994 Denitrification: Production and consumption of nitric oxide. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**: 1053-1058.
- YORDY, D. and DELWICHE, E.A.** 1979 Nitrite reduction in *Veillonella alcalescens*. *Journal Bacteriology*. **137**: 905-911.

- YOSHINARI, T. and KNOWLES, R.** 1976 Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria. *Biochemical Biophysical Res. Commun.* **69**: 705-710.
- ZAFIRAU, O.C.; HONLEY, Q.S. and SNYDER, G.** 1989 Nitric Oxide and nitrous oxide production and cycling during dissimilatory nitrite reduction by *Pseudomonas perfectomarina*. *Journal Biological Chemistry.* **264**: 5694-5699.
- ZALLOLOWICZ, R.M. and FOCHT, D.D.** 1979 Denitrification in anaerobic nitrate dependent acetylene reduction in cowpea rhizobium. *Journal of General Microbiology* **111**: 445-448.
- ZAMORANO, M.; MENÉNDEZ, A.; MORENO, B.; GÓMEZ, M.A.; HONTORIA, E. and GONZÁLEZ, J.** 1996. Utilización de residuos industriales como soporte para la depuración biológica de aguas residuales. *IV Simposium sobre el agua en Andalucía (Almería)* Vol 2: pp 381-390.
- ZAMORANO, M.; MENÉNDEZ, A.; OSORIO, F.; PEREZ, J.I.; HONTORIA, E. and GONZÁLEZ, J.** 1996. Utilización de plástico reciclado como soporte para la depuración biológica de aguas residuales. *IV Simposium sobre el agua en Andalucía (Almería)* Vol 2: pp 361-370.
- ZHANG, L.C. and BISHOP, P.L.** 1994. Density, porosity and pore structure of biofilms. *Water Research* **28**: 2267-2277.
- ZHANG, L.C. and BISHOP, P.L.** 1994a. Structure activity and composition of biofilm. *Water Science and Technology* **29**: 335-344.
- ZHANG, L.C.; FU, Y.C. and BISHOP, P.L.** 1994 Competition in biofilm. *Water Science Technology.* **29**: 263-270.
- ZHAO, H.; ISAACS, S.H.; SOERBERG, H. and KÜMMEL, M.** 1994 A novel control strategy for improved nitrogen removal in an alternating activated sludge process: part I. Process analysis. *Water Research.* **28**: 521-534.
- ZUMFT, W.G.** 1993 The biological role of nitric oxide in bacteria. *Archives of Microbiology.* **160**: 253-264.

# Relación de tablas

---

## I. INTRODUCCIÓN.

Tabla 1.- Composición de los principales fertilizantes empleados .....	8
--	---

## III. MATERIALES Y MÉTODOS.

Tabla 2.- Medio de cultivo modificado de Graham y Parker.....	100
---	-----

## IV. RESULTADOS.

Tabla 3.- Ajuste lineal obtenido para los ensayos con sacarosa en ausencia de O.D. ....	109
Tabla 4.- Ajuste lineal obtenido para los ensayos con metanol en ausencia de O.D. ....	112
Tabla 5.- Ajuste lineal obtenido para los ensayos con etanol en ausencia de O.D. ....	115
Tabla 6.- Ajuste lineal obtenido para los ensayos con sacarosa en presencia de O.D. (4.5 mg/l) .....	119
Tabla 7.- Ajuste lineal obtenido para los ensayos con metanol en presencia de O.D. (4.5 mg/l) .....	122
Tabla 8.- Ajuste lineal obtenido para los ensayos con etanol en presencia de O.D. (4.5 mg/l) .....	126
Tabla 9.- Análisis de varianza realizado para el rendimiento y las concentraciones de $\text{NO}_3^-$ y $\text{NO}_2^-$ en el agua de salida en función de la concentración de O.D. y tipo de fuente de carbono .....	129
Tabla 10.- Ajuste lineal obtenido para la influencia del O.D. en la capacidad de eliminar nitrógeno empleando sacarosa.....	131
Tabla 11.- Ajuste lineal obtenido para la influencia del O.D. en la capacidad de eliminar nitrógeno empleando metanol.....	132
Tabla 12.- Ajuste lineal obtenido para la influencia del O.D. en la capacidad de eliminar nitrógeno empleando etanol.....	134

---

---

Tabla 13.- Ajustes lineales obtenidos entre el tamaño de la biopelícula y la relación C/N, para los ensayos con sacarosa .....	136
Tabla 14.- Ajustes lineales obtenidos entre los recuentos de HAO (ufc/g relleno) y la relación C/N, para los ensayos con sacarosa .....	139
Tabla 15.- Ajustes lineales obtenidos entre los recuentos de desnitrificantes (ufc/g relleno) y la relación C/N, para los ensayos con sacarosa .....	141
Tabla 16.- Ajustes lineales obtenidos entre los recuentos de reductores de nitrato (ufc/g relleno) y la relación C/N, para los ensayos con sacarosa .....	143
Tabla 17.- Coeficientes de correlación obtenidos para el ensayo con sacarosa y sin O.D.....	145
Tabla 18.- Coeficientes de correlación obtenidos para el ensayo con sacarosa y con O.D.....	146
Tabla 19.- Ajustes lineales obtenidos entre el tamaño de la biopelícula y la relación C/N, para los ensayos con metanol.....	148
Tabla 20.- Ajustes lineales obtenidos entre los recuentos de HAO (ufc/g relleno) y la relación C/N, para los ensayos con metanol.....	150
Tabla 21.- Ajustes lineales obtenidos entre los recuentos de desnitrificantes (ufc/g relleno) y la relación C/N, para los ensayos con metanol.....	152
Tabla 22.- Ajustes lineales obtenidos entre los recuentos de reductores de nitrato (ufc/g relleno) y la relación C/N, para los ensayos con metanol.....	155
Tabla 23.- Coeficientes de correlación obtenidos para el ensayo con metanol y sin O.D.....	157
Tabla 24.- Coeficientes de correlación obtenidos para el ensayo con metanol y con O.D.....	158
Tabla 25.- Ajustes lineales obtenidos entre el tamaño de la biopelícula y la relación C/N, para los ensayos con etanol.....	159
Tabla 26.- Ajustes lineales obtenidos entre los recuentos de HAO (ufc/g relleno) y la relación C/N, para los ensayos con etanol.....	161

---

---

Tabla 27.- Ajustes lineales obtenidos entre los recuentos de desnitrificantes (ufc/g relleno) y la relación C/N, para los ensayos con etanol.....	163
Tabla 28.- Ajustes lineales obtenidos entre los recuentos de reductores de nitrato (ufc/g relleno) y la relación C/N, para los ensayos con etanol.....	165
Tabla 29.- Coeficientes de correlación obtenidos para el ensayo con etanol y sin O.D.....	167
Tabla 30.- Coeficientes de correlación obtenidos para el ensayo con etanol y con O.D.....	168
Tabla 31.- Actividad desnitrificante de las diferentes cepas aisladas.....	180
Tabla 32.- Análisis de varianza y test "t" de student realizado para los concentraciones de nitrógeno presentes en las diferentes alturas de la columna, en función de la carga superficial.....	197
Tabla 33.- Análisis de varianza y test "t" de student realizado para los tamaños de biopelícula determinados para las diferentes alturas de la columna y la carga superficial ensayada.....	202
Tabla 34.- Análisis de varianza y test "t" de student realizado para los recuentos de HAO determinados para las diferentes alturas de la columna y la carga superficial ensayada.....	204
Tabla 35.- Análisis de varianza y test "t" de student realizado para los recuentos de desnitrificantes determinados para las diferentes alturas de la columna y la carga superficial ensayada.....	206
Tabla 36.- Análisis de varianza y test "t" de student realizado para los recuentos de reductores de nitrato determinados para las diferentes alturas de la columna y la carga superficial ensayada.....	208
Tabla 37.- Análisis de varianza y test "t" de student realizado para los concentraciones de nitrógeno presentes en las diferentes alturas de la columna, en función de la carga hidráulica.....	214

---

---

Tabla 38.- Análisis de varianza y test "t" de student realizado para los tamaños de biopelícula determinados para las diferentes alturas de la columna y la carga hidráulica ensayada.....	219
Tabla 39.- Análisis de varianza y test "t" de student realizado para los recuentos de HAO determinados para las diferentes alturas de la columna y la carga hidráulica ensayada.....	221
Tabla 40.- Análisis de varianza y test "t" de student realizado para los recuentos de desnitrificantes determinados para las diferentes alturas de la columna y la carga hidráulica ensayada.....	223
Tabla 41.- Análisis de varianza y test "t" de student realizado para los recuentos de reductores de nitrato determinados para las diferentes alturas de la columna y la carga hidráulica ensayada.....	226

---

# Índice de figuras

---

## Introducción

Figura 1.- Mapa de contaminación por $\text{NO}_3^-$ en España para 1987.....	5
Figura 2.- Formación del ión del ácido nitroso a partir de nitrito y en medio ácido .....	16
Figura 3.- Formación de nitrosaminas a partir del ion del ácido nitroso .....	17
Figura 4.- Ciclo del Nitrógeno.....	23
Figura 5.- Diagrama de transporte de electrones en la desnitrificación.....	43
Figura 6.- Esquema de los reactores de biopelícula más empleados.....	56

## Materiales y Métodos

Figura 7.- Ubicación de la planta semitécnica, sobre el acuífero de la vega de Granada....	73
Figura 8.- Esquema de la planta piloto empleada en la investigación.....	75
Figura 9.- Dimensiones de la planta piloto a escala semi-técnica.....	76
Figura 10.- Disposición de los muestreadores en la planta piloto.....	77

## Resultados

Figura 11.- Ajuste lineal entre la sacarosa adicionada y el nitrógeno eliminado. Ensayo sin O.D.....	110
Figura 12.- Concentración de $\text{NO}_3^-$ y $\text{NO}_2^-$ en el agua tratada en función de la concentración de sacarosa adicionada. Proceso sin O.D. y con 100 mg/l de $\text{NO}_3^-$ en el agua a tratar.....	110
Figura 13.- Concentración de sacarosa en el agua de salida. Proceso sin O.D.....	111
Figura 14.- Ajuste lineal entre la metanol adicionado y el nitrógeno eliminado. Ensayo sin O.D.....	113

---

---

Figura 15.- Concentración de $\text{NO}_3^-$ y $\text{NO}_2^-$ en el agua tratada en función de la concentración de metanol adicionado. Proceso sin O.D. y con 100 mg/l de $\text{NO}_3^-$ en el agua a tratar.....	114
Figura 16.- Concentración de metanol en el agua de salida. Proceso sin O.D.....	114
Figura 17.- Ajuste lineal entre la etanol adicionado y el nitrógeno eliminado. Ensayo sin O.D.....	116
Figura 18.- Concentración de $\text{NO}_3^-$ y $\text{NO}_2^-$ en el agua tratada en función de la concentración de etanol adicionado. Proceso sin O.D. y con 100 mg/l de $\text{NO}_3^-$ en el agua a tratar.....	117
Figura 19.- Concentración de etanol en el agua de salida. Proceso sin O.D.....	117
Figura 20.- Ajustes lineales obtenidos para sacarosa en presencia y ausencia de O.D.....	120
Figura 21.- Concentración de $\text{NO}_3^-$ y $\text{NO}_2^-$ en el agua tratada en función de la concentración de sacarosa adicionada. Proceso con O.D. (4.5 mg/l) y con 100 mg/l de $\text{NO}_3^-$ en el agua a tratar.....	121
Figura 22.- Concentración de sacarosa en el agua de salida. Proceso con O.D (4.5 mg/l).....	122
Figura 23.- Ajustes lineales obtenidos para metanol en presencia y ausencia de O.D.....	123
Figura 24.- Concentración de $\text{NO}_3^-$ y $\text{NO}_2^-$ en el agua tratada en función de la concentración de metanol adicionada. Proceso con O.D. (4.5 mg/l) y con 100 mg/l de $\text{NO}_3^-$ en el agua a tratar.....	124
Figura 25.- Concentración de metanol en el agua de salida. Proceso con O.D (4.5 mg/l).....	125
Figura 26.- Ajustes lineales obtenidos para etanol en presencia y ausencia de O.D.....	127
Figura 27.- Concentración de $\text{NO}_3^-$ y $\text{NO}_2^-$ en el agua tratada en función de la concentración de etanol adicionada. Proceso con O.D. (4.5 mg/l) y con 100 mg/l de $\text{NO}_3^-$ en el agua a tratar.....	127
Figura 28.- Concentración de etanol en el agua de salida. Proceso con O.D (4.5 mg/l).....	128

---

---

Figura 29.- Influencia del oxígeno en la capacidad de eliminación de nitrógeno para cada fuente de carbono ensayada: regresiones lineales.....	130
Figura 30.- Valores de $\text{NO}_3^-$ y $\text{NO}_2^-$ en el agua de salida en función de la concentración de O.D.. Ensayo realizado con sacarosa.....	132
Figura 31.- Valores de $\text{NO}_3^-$ y $\text{NO}_2^-$ en el agua de salida en función de la concentración de O.D.. Ensayo realizado con metanol.....	133
Figura 32.- Valores de $\text{NO}_3^-$ y $\text{NO}_2^-$ en el agua de salida en función de la concentración de O.D.. Ensayo realizado con etanol.....	134
Figura 33.- Tamaño de la biopelícula (mg/g relleno) en función de la relación C/N. Ensayos realizados con y sin O.D. y empleando sacarosa.....	138
Figura 34.- Recuentos de HAO (ufc/g relleno) en función de la relación C/N. Ensayos realizados con y sin O.D. y empleando sacarosa.....	140
Figura 35.- Recuentos de desnitrificantes (ufc/g relleno) en función de la relación C/N. Ensayos realizados con y sin O.D. y empleando sacarosa.....	142
Figura 36.- Recuentos de Reductores de nitrato (ufc/g relleno) en función de la relación C/N. Ensayos realizados con y sin O.D. y empleando sacarosa.....	144
Figura 37.- Tamaño de la biopelícula (mg/g relleno) en función de la relación C/N. Ensayos realizados con y sin O.D. y empleando metanol.....	149
Figura 38.- Recuentos de HAO (ufc/g relleno) en función de la relación C/N. Ensayos realizados con y sin O.D. y empleando metanol.....	151
Figura 39.- Recuentos de desnitrificantes (ufc/g relleno) en función de la relación C/N. Ensayos realizados con y sin O.D. y empleando metanol.....	153
Figura 40.- Recuentos de Reductores de nitrato (ufc/g relleno) en función de la relación C/N. Ensayos realizados con y sin O.D. y empleando sacarosa.....	154
Figura 41.- Tamaño de la biopelícula (mg/g relleno) en función de la relación C/N. Ensayos realizados con y sin O.D. y empleando etanol.....	160
Figura 42.- Recuentos de HAO (ufc/g relleno) en función de la relación C/N. Ensayos realizados con y sin O.D. y empleando etanol.....	162

---

---

Figura 43.- Recuentos de desnitrificantes (ufc/g relleno) en función de la relación C/N. Ensayos realizados con y sin O.D. y empleando etanol.....	164
Figura 44.- Recuentos de Reductores de nitrato (ufc/g relleno) en función de la relación C/N. Ensayos realizados con y sin O.D. y empleando etanol.....	166
Figura 45.- Número de bacterias desnitrificantes en función de la relación C/N, obtenidos en los ensayos con sacarosa y sin O.D.. Recuentos para cada especie identificada.....	170
Figura 46.- Número de bacterias desnitrificantes en función de la relación C/N, obtenidos en los ensayos con sacarosa y con O.D.. Recuentos para cada especie identificada.....	172
Figura 47.- Número de bacterias desnitrificantes en función de la relación C/N, obtenidos en los ensayos con metanol y sin O.D.. Recuentos para cada especie identificada.....	173
Figura 48.- Número de bacterias desnitrificantes en función de la relación C/N, obtenidos en los ensayos con metanol y con O.D.. Recuentos para cada especie identificada.....	175
Figura 49.- Número de bacterias desnitrificantes en función de la relación C/N, obtenidos en los ensayos con etanol y sin O.D.. Recuentos para cada especie identificada.....	176
Figura 50.- Número de bacterias desnitrificantes en función de la relación C/N, obtenidos en los ensayos con etanol y con O.D.. Recuentos para cada especie identificada.....	178
Figura 51.- Actividad desnitrificante (nmol/ufc.h) de las cepas aisladas en los ensayos con sacarosa y presencia de O.D., en función de la relación C/N.....	184
Figura 52.- Actividad desnitrificante (nmol/ufc.h) de las cepas aisladas en los ensayos con sacarosa y ausencia de O.D., en función de la relación C/N.....	185
Figura 53.- Comparación de las actividades desnitrificantes potenciales obtenidas para los ensayos con sacarosa.....	186

---

---

Figura 54.- Actividad desnitrificante (nmol/ufc.h) de las cepas aisladas en los ensayos con metanol y presencia de O.D., en función de la relación C/N.....	186
Figura 55.- Actividad desnitrificante (nmol/ufc.h) de las cepas aisladas en los ensayos con metanol y ausencia de O.D., en función de la relación C/N.....	187
Figura 56.- Comparación de las actividades desnitrificantes potenciales obtenidas para los ensayos con metanol.....	188
Figura 57.- Actividad desnitrificante (nmol/ufc.h) de las cepas aisladas en los ensayos con etanol y presencia de O.D., en función de la relación C/N.....	189
Figura 58.- Actividad desnitrificante (nmol/ufc.h) de las cepas aisladas en los ensayos con etanol y ausencia de O.D., en función de la relación C/N.....	190
Figura 59.- Comparación de las actividades desnitrificantes potenciales obtenidas para los ensayos con etanol.....	191
Figura 60.- División por especies de la actividad desnitrificante potencial, obtenida en los ensayos con etanol y presencia de O.D.....	192
Figura 61.- División por especies de la actividad desnitrificante potencial, obtenida en los ensayos con etanol y ausencia de O.D.....	192
Figura 62.- Concentraciones de nitrato y nitrito en el agua de salida, en función de la carga superficial. Ensayo realizado con la dosificación de etanol necesaria para obtener el máximo rendimiento.....	194
Figura 63.- Concentraciones de etanol en el agua de salida para las diferentes cargas superficiales ensayadas. Ensayo realizado con adiciones de etanol adecuadas para obtener el máximo rendimiento.....	195
Figura 64.- Variación del nitrato eliminado y el carbono consumido con el incremento de la carga superficial. Ensayo realizado con adiciones de etanol adecuadas para obtener el máximo rendimiento.....	196
Figura 65.- Variación de las concentraciones de nitrato, nitrito y etanol en función de la altura del lecho biológico para la carga 0.43 Kg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /m <sup>2</sup> ·día.....	198
Figura 66.- Variación de las concentraciones de nitrato, nitrito y etanol en función de la altura del lecho biológico para la carga 0.93 Kg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /m <sup>2</sup> ·día.....	198

---

---

Figura 67.- Variación de las concentraciones de nitrato, nitrito y etanol en función de la altura del lecho biológico para la carga 1.39 Kg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /m <sup>2</sup> ·día.....	199
Figura 68.- Variación de las concentraciones de nitrato, nitrito y etanol en función de la altura del lecho biológico para la carga 1.85 Kg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /m <sup>2</sup> ·día.....	200
Figura 69.- Variación de las concentraciones de nitrato, nitrito y etanol en función de la altura del lecho biológico para la carga 2.31 Kg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /m <sup>2</sup> ·día.....	201
Figura 70.- Variación del tamaño de la biopelícula en función de la carga superficial ensayada y la altura de muestreo.....	203
Figura 71.- Variación de los recuentos de HAO en función de la carga superficial ensayada y la altura de muestreo.....	205
Figura 72.- Variación de los recuentos de desnitrificantes en función de la carga superficial ensayada y la altura de muestreo.....	207
Figura 73.- Variación de los recuentos de reductores de nitrato en función de la carga superficial ensayada y la altura de muestreo.....	209
Figura 74.- Concentraciones de nitrato y nitrito en el agua de salida, en función de la carga hidráulica. Ensayo realizado con la dosificación de etanol necesaria para obtener el máximo rendimiento.....	211
Figura 75.- Concentraciones de etanol en el agua de salida para las diferentes cargas hidráulicas ensayadas. Ensayo realizado con adiciones de etanol adecuadas para obtener el máximo rendimiento.....	212
Figura 76.- Variación del nitrato eliminado y el carbono consumido con el incremento de la carga hidráulica. Ensayo realizado con adiciones de etanol adecuadas para obtener el máximo rendimiento.....	213
Figura 77.- Variación de las concentraciones de nitrato, nitrito y etanol en función de la altura del lecho biológico para la carga hidráulica 4.68 m <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> ·día.....	215
Figura 78.- Variación de las concentraciones de nitrato, nitrito y etanol en función de la altura del lecho biológico para la carga hidráulica 8.05 m <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> ·día.....	216
Figura 79.- Variación de las concentraciones de nitrato, nitrito y etanol en función de la altura del lecho biológico para la carga hidráulica 10.18 m <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> ·día.....	217

---

---

Figura 80.- Variación de las concentraciones de nitrato, nitrito y etanol en función de la altura del lecho biológico para la carga hidráulica $14.26 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{día}$ .....	217
Figura 81.- Variación de las concentraciones de nitrato, nitrito y etanol en función de la altura del lecho biológico para la carga hidráulica $18.33 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{día}$ .....	218
Figura 82.- Variación del tamaño de la biopelícula en función de la carga hidráulica ensayada y la altura de muestreo.....	220
Figura 83.- Variación de los recuentos de HAO en función de la carga hidráulica ensayada y la altura de muestreo.....	222
Figura 84.- Variación de los recuentos de desnitrificantes en función de la carga hidráulica ensayada y la altura de muestreo.....	224
Figura 85.- Variación de los recuentos de reductores de nitrato en función de la carga hidráulica ensayada y la altura de muestreo.....	226

---