

UNIVERSIDAD DE GRANADA

E.T.S. I. CAMINOS	
BIBLIOTECA	
CDU	T-628
AUTOR	MOR
TITULO	mej

**E.T.S. DE INGENIEROS DE CAMINOS,
CANALES Y PUERTOS**

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



**MEJORA DE LOS PARÁMETROS DE DISEÑO DE
FILTROS SUMERGIDOS APLICADOS A LA
DESNITRIFICACIÓN DE AGUAS SUBTERRÁNEAS
MEDIANTE LA INOCULACIÓN SELECTIVA**

Begoña Moreno Escobar

Tesis Doctoral

**Para la obtención del
GRADO DE DOCTOR EN INGENIERÍA DE
CAMINOS, CANALES Y PUERTOS**

Granada, 2001

UNIVERSIDAD DE GRANADA

**E.T.S. DE INGENIEROS DE CAMINOS,
CANALES Y PUERTOS**

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



**MEJORA DE LOS PARÁMETROS DE DISEÑO DE
FILTROS SUMERGIDOS APLICADOS A LA
DESNITRIFICACIÓN DE AGUAS SUBTERRÁNEAS
MEDIANTE LA INOCULACIÓN SELECTIVA**

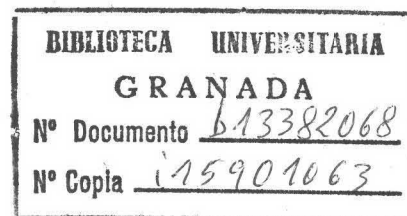
Begoña Moreno Escobar

Tesis Doctoral

**Para la obtención del
GRADO DE DOCTOR EN INGENIERÍA DE
CAMINOS, CANALES Y PUERTOS**

**Directores:
ERNESTO HONTORIA GARCÍA
MIGUEL ÁNGEL GÓMEZ NIETO**

Granada, 2001



UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CIVIL, INSTITUTO DEL AGUA

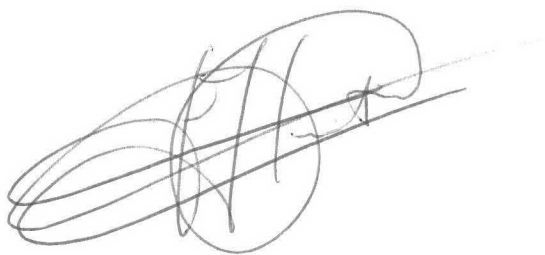
**Mejora de los parámetros de diseño de filtros sumergidos aplicados a la
desnitrificación de aguas subterráneas mediante la inoculación selectiva.**

Memoria presentada por Dña. Begoña Moreno Escobar para
aspirar al grado de Doctor en Ingeniería de Caminos, Canales y Puertos.



Fdo.: Dña. Begoña Moreno Escobar

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. Miguel Ángel Gómez Nieto
Profesor del Área de Tecnologías
del Medio Ambiente.
Departamento de Ingeniería Civil.
Universidad de Granada.

Granada, 2001

Este trabajo ha sido financiado por los siguientes proyectos:

- **Proyecto AMB95-0621 de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (Plan Nacional de I+D).**
- **Proyecto 1FD97-0986 de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (Fondos FEDER).**
- **Contrato 1213 financiado por el Ministerio de Medio Ambiente (Confederación Hidrográfica del Guadalquivir).**

RESUMEN

La biodesnitrificación aplicada mediante filtros sumergidos es una tecnología viable, tanto técnica como económicamente, para eliminar nitrato de aguas subterráneas contaminadas. Esto soluciona problemas de abastecimiento principalmente en pequeños municipios que emplean las aguas subterráneas como único recurso hídrico para la obtención de agua potable.

La composición microbiológica de la biopelícula es el principal factor que determina el rendimiento del proceso, por lo tanto la aplicación de cepas bacterianas con alto poder desnitrificante y capacidad para formar biopelículas estables en la inoculación del filtro biológico, mejoran los parámetros de diseño del filtro así como la explotación del proceso.

Para los ensayos realizados a escala semi-técnica con la cepa *Hydrogenophaga pseudoflava* se alcanzaron como valores de **carga hidráulica $30 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{d}$** y de **carga superficial de nitrato $9 \text{ Kg}/\text{m}^2\cdot\text{d}$** . Partiendo de estos parámetros se puede construir una planta a escala industrial montada sobre plataforma móvil que pueda solucionar problemas puntuales de contaminación que dejan sin agua potable a pequeños núcleos de población.

ÍNDICE

I.- <u>INTRODUCCIÓN</u>	I.1.
I.1.- PROBLEMÁTICA ACTUAL DE LA CONTAMINACIÓN DE AGUAS SUBTERRÁNEAS POR NITRATO	I.3.
I.1.1.- <u>Fuentes de contaminación de aguas subterráneas por nitrato</u>	I.6.
I.1.2.- <u>Grado actual de contaminación de los acuíferos</u>	I.15.
I.1.3.- <u>Problemas sociales desencadenados</u>	I.20.
I.1.3.1.- Patologías	I.20.
I.1.3.2.- Eutrofización	I.22.
I.1.4.- <u>Tendencias actuales para controlar el problema de la contaminación.</u> <u>Legislación.</u>	I.25.
I.2.- TECNOLOGÍAS ACTUALES PARA ELIMINAR EL NITRATO DEL AGUA SUBTERRÁNEA	I.30.
I.2.1.- <u>Procesos físico-químicos</u>	I.34.
I.2.2.- <u>Procesos físicos</u>	I.36.
I.3.- PROCESOS BIOLÓGICOS DE DESNITRIFICACIÓN	I.43.
I.3.1.- <u>Ciclo del nitrógeno</u>	I.43.
I.3.2.- <u>Desnitrificación</u>	I.46.
I.3.2.1.- Microorganismos desnitrificantes	I.47.
I.3.2.2.- Factores que afectan a la desnitrificación	I.48.
I.3.3.- <u>Aplicación del proceso de desnitrificación</u>	I.53.
I.3.3.1.- Biopelículas: concepto y funcionamiento.	I.55.
I.3.3.2.- Sistemas para aplicar el proceso de desnitrificación	I.57.
I.3.4.- <u>Filtros sumergidos. Estado actual del proceso</u>	I.65.
II.- <u>INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	II.1.

III.- <u>OBJETIVOS</u>	III.1.
IV.- <u>METODOLOGÍA ANALÍTICA Y MÉTODOS DE ESTUDIO</u>	IV.1.
IV.1.- BACTERIAS DESNITRIFICANTES EMPLEADAS.	IV.1.
IV.1.1.- <u>Extracción de la biopelícula del material de relleno</u>	IV.2.
IV.1.2.- <u>Aislamiento de microorganismos mediante cultivo en medios selectivos</u>	IV.2.
IV.1.3.- <u>Selección de microorganismos desnitrificantes</u>	IV.4.
IV.1.4.- <u>Identificación de las bacterias</u>	IV.5.
IV.1.5.- <u>Caracterización de la actividad desnitrificante</u>	IV.5.
IV.2.- CONSERVACIÓN DE LOS INOCULANTES	IV.9.
IV.3.- INOCULACIÓN DEL SISTEMA	IV.10.
IV.4.- ESTUDIOS SOBRE LA FORMACIÓN Y ACTIVIDAD DE LA BIOPELÍCULA	IV.13.
IV.4.1.- <u>Estudio de composición microbiológica de la biopelícula</u>	IV.13.
IV.4.2.- <u>Estudios de microscopía de barrido de superficie</u>	IV.14.
IV.4.3.- <u>Estudios sobre la actividad de la biopelícula</u>	IV.14.
IV.5.- ESTUDIOS DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL AGUA TRATADA	IV.15.
IV.5.1.- <u>Determinación de la turbidez</u>	IV.16.
IV.5.2.- <u>Determinación de nitrato</u>	IV.17.
IV.5.3.- <u>Determinación de nitrito</u>	IV.18.
IV.5.4.- <u>Determinación de microorganismos totales en el agua tratada</u>	IV.20.
IV.5.5.- <u>Determinación de indicadores de contaminación fecal en el agua tratada</u>	IV.20.

IV.6.- IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA MEDIANTE AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN PARCIAL DEL GEN CODIFICANTE DEL ARN RIBOSÓMICO 16S (rADN 16 S)	IV22.
IV.7.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	IV.24.
V.- <u>INVESTIGACIÓN DE CHOQUE</u>	V.1.
V.1.- DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA PILOTO A ESCALA DE LABORATORIO	V.3.
V.2.- PLAN DE TRABAJO	V.8.
V.3.- 1ª FASE DE LA INVESTIGACIÓN DE CHOQUE	V.9.
V.3.1.- <u>Variables y parámetros de la 1ª fase de la investigación de choque</u>	V.10.
V.3.2.- <u>Resultados previos de la 1ª fase</u>	V.11.
V.3.3.- <u>Conclusiones previas</u>	V.29.
V.4.- 2ª FASE DE LA INVESTIGACIÓN DE CHOQUE	V.31.
V.4.1.- <u>Variables y parámetros de la 2ª fase de la investigación de choque</u>	V.32.
V.4.2.- <u>Resultados previos de la 2ª fase</u>	V.34.
V.4.2.1.- Resultados sobre las muestras de relleno	V.35.
V.4.2.2.- Resultados sobre las muestras de agua	V.43.
V.4.3.- <u>Conclusiones previas</u>	V.66.
V.5.- 3ª FASE DE LA INVESTIGACIÓN DE CHOQUE	V.68.
V.5.1.- <u>Variables y parámetros de la 3ª fase de la investigación de choque</u>	V.68.
V.5.2.- <u>Resultados previos de la 3ª fase</u>	V.70.
V.5.2.1.- Resultados sobre las muestras de relleno	V.71.
V.5.2.2.- Resultados sobre las muestras de agua	V.76.

V.5.3.- <u>Conclusiones previas</u>	V.84.
V.6.- 4ª FASE DE LA INVESTIGACIÓN DE CHOQUE	V.85.
V.6.1.- <u>Variables y parámetros de la 4ª fase de la investigación de choque</u>	V.86.
V.6.2.- <u>Resultados previos de la 4ª fase</u>	V.87.
V.6.2.1.- Resultados de la mezcla <i>Ps. mendocina</i> y <i>Ps. fluorescens</i>	V.87.
V.6.2.2.- Resultados de la mezcla <i>Agrobacterium radiobacter</i> y <i>Ps. fluorescens</i>	V.96.
V.6.2.3.- Resultados de la mezcla <i>Ps. mendocina</i> , <i>Agrobacterium radiobacter</i> y <i>Ps. fluorescens</i>	V.107.
V.6.2.4.- Resultados de la mezcla <i>Ps. mendocina</i> y <i>Agrobacterium radiobacter</i>	V.116.
V.6.2.5.- Resultados de la mezcla <i>Agrobacterium radiobacter</i> y <i>Ps. pickettii</i>	V.124.
V.6.3.- <u>Conclusiones previas</u>	V.132.
VI.- <u>INVESTIGACIÓN DE FONDO</u>	VI.1.
VI.1.- DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA PILOTO A ESCALA SEMI-TÉCNICA	VI.2.
VI.2.- MODIFICACIÓN DE VARIABLES Y PARÁMETROS.....	VI.9.
VI.3.- PLAN DE TRABAJO	VI.10.
VI.4.- RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN DE FONDO	VI.12.
VI.4.1.- <u>Influencia de la carga hidráulica</u>	VI.12.
VI.4.2.- <u>Influencia de la carga superficial</u>	VI.24.
VI.4.3.- <u>Recuperación tras lavados</u>	VI.32.
VI.4.4.- <u>Comportamiento de la DQO</u>	VI.33.

VII.- <u>DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS</u>	VII.1.
VIII.- <u>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</u>	VIII.1.
IX.- <u>DISEÑO DE LA PLANTA A ESCALA INDUSTRIAL</u>	IX.1.
X.- <u>LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN</u>	X.1.
XI.- <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	XI.1.

I.- INTRODUCCIÓN

I.- INTRODUCCIÓN

La agricultura intensiva lleva consigo la aplicación incontrolada de fertilizantes, que en el caso del nitrato, por su alta solubilidad, puede ser arrastrado por los lixiviados del terreno alcanzando el nivel freático (Prasad, 1999; Agrawal, 1999). Esto da lugar a una acumulación en el agua subterránea, viéndose alterada su calidad por el incremento de la concentración de dicho anión.

La Organización Mundial de la Salud (W.H.O., 1985) manifestó que la ingesta de nitrato podría ser causante de enfermedades como la methemoglobinemia o el cáncer de estómago, lo cual puede afectar tanto a animales como al ser humano, siendo los bebés población de alto riesgo. Esto obligó a las autoridades a establecer límites en la concentración de nitrato en las aguas destinadas al consumo público, al igual que para el nitrito, verdadero causante de estos problemas de salud pública. Estos límites se establecieron en 50 mg/l para el nitrato y en 0,1 mg/l para el nitrito (Real Decreto 1138/1990, de 14 de Septiembre de 1990).

Así pues, la presencia de altas concentraciones tanto de nitrato como de nitrito en las aguas subterráneas limita los usos de este recurso hídrico, lo cual choca con el constante desarrollo de la sociedad que demanda mayores cantidades de agua. Este problema se acentúa en zonas áridas o semiáridas de agricultura intensiva, como son los países mediterráneos, siendo más afectados los pequeños núcleos de población. Épocas especialmente secas agravan el problema, ya que en estas situaciones los pequeños núcleos urbanos cuentan sólo con las aguas subterráneas como recurso hídrico para abastecer a la población.

La reducción de los recursos hídricos destinables a la producción de agua potable genera problemas de tipo socio-económico, cuya solución está en controlar la contaminación, bien por una concienciación de los propios agricultores (el aporte de nitratos al acuífero se puede disminuir aplicando fertilizantes de lixiviado lento y

haciéndolo en las épocas adecuadas en las que se necesita para el crecimiento de las plantas) (Sahuquillo Herráiz, 1999) o bien por una limitación en la aplicación de fertilizantes al terreno. Esta solución que se ha puesto en marcha en diversos países (D. 91/676 CEE), es una apuesta de futuro que no siempre es posible llevar a cabo y que no plantea una solución inmediata a un problema de contaminación difusa de aguas subterráneas.

Hoy día la contaminación por nitrato afecta a numerosos acuíferos por todo el mundo. El control de esta contaminación es una solución a largo plazo; la solución inmediata consiste en tratar las aguas subterráneas contaminadas, de modo que se reduzcan las concentraciones de nitrato y nitrito bajo los límites establecidos por la legislación. El tratamiento del agua o bien su dilución con otros recursos hídricos, siempre que sea posible, son en ocasiones las únicas opciones para poder obtener agua potable en muchas zonas del planeta. Sin embargo estas opciones se encuentran con grandes dificultades económicas, difíciles de solventar, ya que el problema es más grave en los pequeños núcleos de población que cuentan con escasos recursos económicos. Esta problemática demanda una tecnología viable tanto técnica, como económica, que permita solucionar el problema de forma puntual, dotando así a una población de agua para el abastecimiento, sin que esto suponga un alto coste económico.

I.1.- PROBLEMÁTICA ACTUAL DE LA CONTAMINACIÓN DE AGUAS SUBTERRÁNEAS POR NITRATO

El interés sobre la contaminación de las aguas subterráneas ha venido aumentando en el mundo desarrollado durante los últimos años. En los Estados Unidos el agua subterránea es la principal fuente de agua potable, con ella se abastece a más del 50% de la población. Lo mismo sucede en gran parte de los países de Europa: en Francia es más del 60% ese porcentaje y se acerca o supera al 70% en muchos países de la comunidad europea, alcanzando Dinamarca prácticamente el 100%. En muchos países a pesar de la poca atención dedicada a las aguas subterráneas y a los errores persistentes sobre sus méritos y posibilidades de los responsables de la planificación hidráulica, la utilización es lo bastante importante como para que su gestión merezca una atención preferente y que se las defienda contra la contaminación. En cualquier caso el no hacerlo supone desestimar alternativas que en muchos casos no sólo son adecuadas sino que con frecuencia son más convenientes desde los puntos de vista económico, estratégico y ambiental: También hay que tener en cuenta la relación con las aguas superficiales a las que se puede transferir la contaminación de los acuíferos que son drenados por éstas, y viceversa que las aguas que circulan por superficie puedan transferir su contaminación a acuíferos en el caso de circular por cauces perdedores, y que de ellas dependan ecosistemas del mayor interés localizados en zonas húmedas.

Al problema de la contaminación de las aguas subterráneas no se le ha dedicado hasta ahora en la mayoría de los países la atención que merece (Sahuquillo Herráiz, 1999). Excepto en unos pocos países desarrollados en los que existe una concienciación ambiental desarrollada, existen muy pocos estudios de detalle a escala nacional, y muchos de los realizados son de reconocimiento y a gran escala. El mayor número de estudios publicados es sobre nitratos.

La calidad de un acuífero puede alterarse por causas naturales o por factores externos, que si son ajenos al ciclo hidrológico se denominan **CONTAMINACIÓN**. Esta contaminación a su vez se puede clasificar en dos tipos:

- **Puntual:** originada por un foco puntual, principalmente de origen 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 de basuras o la contaminación por materia orgánica procedente de fosas sépticas o filtración de aguas residuales, etc.
- **Difusa:** cuando la entrada del contaminante se distribuye por una zona amplia del acuífero. La mayor parte de la contaminación difusa de las aguas superficiales está relacionada con toda una serie de actividades, eminentemente agrícolas y ganaderas, que se desarrollan sobre grandes extensiones del territorio, y que provocan la contaminación de esta agua superficial por medio de la escorrentía que fluye por su superficie y que arrastra y disuelve las sustancias que han sido depositadas sobre el suelo.

Las sustancias más comunes que se encuentran en las aguas en relación con esta contaminación difusa (Libro Blanco del Agua en España, 1998) pertenecen al grupo de los fertilizantes y de los fitosanitarios, empleados en la agricultura (teniendo especial interés el nitrato y los pesticidas debido a sus efectos sobre la salud humana y a los problemas de eutrofización), al de la materia orgánica y las sustancias tóxicas, ligadas a las actividades ganaderas y a los vertederos urbanos o a determinadas actividades industriales.

La contaminación difusa tiende a adquirir cada vez mayor importancia en la degradación de los recursos hídricos, ya que cuanto mayor sea el grado de depuración y de limitación de los vertidos puntuales, mayor será el incremento que

del total de la contaminación supondrán todos los vertidos de carácter distribuido o difuso. A modo de ejemplo, se estima que la aportación de nitrógeno de origen difuso en la cuenca del Duero representa aproximadamente el 80% de la aportación total de nitrógeno de la cuenca. En las cuencas del Tajo y del Guadiana la contaminación de origen difuso representa casi la mitad de los aportes totales de nitrógeno (Libro Blanco del Agua en España, 1998).

Existe un importante déficit en lo que se refiere a los estudios que determinen de manera clara la componente difusa de la contaminación de las aguas superficiales españolas. Las bajas calidades detectadas en el agua durante muchos fenómenos de crecidas y fuertes lluvias se deben a la remoción de contaminantes depositados sobre el suelo previamente y que se movilizan precisamente durante estos cortos períodos de tiempo provocando puntas de polución e importantes episodios de contaminación.

La *limitación de la contaminación difusa* sólo puede lograrse mediante medidas preventivas tales como la limitación de la aplicación de fertilizantes y plaguicidas, la limitación en la aplicación de estiércol, y la ordenación de los vertederos en aquellas zonas que presenten un potencial importante de contaminación difusa. De este tipo son las medidas que propone la Directiva 91/276, relativa a la protección de las aguas contra la contaminación producida por nitratos de origen agrícola, que fue traspuesta por Real Decreto 261/1996 de 16 de Febrero.

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_3^- 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.

En ocasiones se han adoptado o propugnado acciones que han consistido en sustituir el aprovechamiento del acuífero por otra fuente de agua con el argumento de estar éste contaminado. Y ello antes de hacer un estudio suficientemente detallado de su extensión y de las alternativas posibles. Esto en la práctica equivale a alentar, o al menos permitir que se agrave la posible contaminación. El acuífero de la Plana de Valencia (Sahuquillo Herráiz, 1999) que estaba abasteciendo a toda la población costera, excepto a la de Valencia capital, se sustituyó en buena parte con agua procedente del Júcar a un coste bastante elevado. Algunos de los sondeos perforados para paliar la sequía en el verano de 1995 han demostrado la existencia de acuíferos inferiores con bajo contenido de nitratos, y parece evidente que muchas de las perforaciones existentes ponen en contacto acuíferos más profundos con acuíferos más superficiales; acuíferos que pueden transmitir tanto nitratos como otros compuestos al ser más vulnerables los acuíferos someros. Esto pone en peligro a un acuífero como el de la Plana de Valencia que es sin duda de una gran importancia económica y estratégica. La decisión de cambiar de fuente de abastecimiento dejará en la práctica indefenso contra la contaminación a un elemento muy valioso que podría jugar en el próximo futuro un papel de primer orden. Es necesario tratar de forma adecuada las posibilidades de utilización de aguas subterráneas y considerar adecuadamente su gestión y la necesaria protección contra la contaminación.

I.1.1.- Fuentes de contaminación de aguas subterráneas por nitrato

La aplicación excesiva o inadecuada de los fertilizantes nitrogenados en la agricultura se destaca hoy en día como el principal agente causante de la contaminación por NO_3^- de nuestros acuíferos (Real Decreto, núm 261/1996), sin embargo hay que destacar que otros aspectos, como las características y composición del suelo así como la irrigación del terreno pueden influir en el mayor o menor arrastre de 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 NO_3^- presente (Adelmon y Tabidian, 1996).

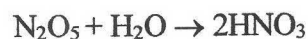
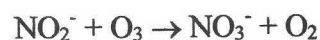
Así pues, aunque las prácticas agrícolas son las principales responsables del incremento de NO_3^- en los acuíferos, hay otra serie de vías naturales y antropogénicas de aporte de este anión a nuestro subsuelo. La *entrada de NO_3^- a los acuíferos puede producirse por:*

- **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 (NO_x). Lloyd y Heathcote (1985) consideraban su procedencia 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_2SO_4 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 NO_x :



La concentración de NO_3^- 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).

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

Según Sanchis (1990) se puede estimar que una tonelada de residuos sólidos urbanos proporcionan unos 275 gr. de nitrógeno. Este nitrógeno puede llegar a las aguas subterráneas, proceso que está unánimemente aceptado (I.T.G.M.E. 1989), siendo este aporte causado por la aparición de lixiviados dados al sobresaturarse un vertedero.

Lógicamente al ser los lixiviados un medio reductor, el principal aporte de Nitrógeno será en forma de NH_4^+ . Este NH_4^+ al alcanzar un medio oxidante como es el agua no contaminada pasaría fácilmente a NO_3^- . Como ejemplo de la alta concentración de nitrógeno en forma de amonio en el lixiviado se encuentra el procedente del vertedero de Hong Kong con valores de 5000 mg/l (Esnault, 1996).

El mayor o menor grado de contaminación de un acuífero por un vertedero dependerá del tratamiento que recibe el vertedero, de las condiciones climáticas e hidrológicas, de las características hidrogeológicas, etc. por lo que un vertedero incontrolado presentará mayores efectos de contaminación al carecer de cualquier control, existiendo numerosos casos de contaminación del agua subterránea por estos vertederos. Sin embargo, es difícil estimar la extensión temporal y espacial de esta contaminación debido a que en el acuífero se producen reacciones químicas y biológicas muy complejas.

Un ejemplo de este tipo de contaminación la indicó Custodio (1981) en el acuífero de Garraf, en el cual comprobó como cerca del vertedero el acuífero presenta concentraciones de NH_4^+ elevadas y en zonas alejadas aparecen ya concentraciones de NO_3^- que llegaban a valores de 28 ppm.

Mikac, *et al*, (1998) estudiaron la contaminación del agua subterránea producida por el principal vertedero de la ciudad de Zagreb (Croacia), el cual contiene 5 millones de toneladas de residuo sólido, tratándose principalmente de residuos sólidos urbanos. Dicho vertedero está localizado en un acuífero aluvial altamente permeable. Los valores de las

concentraciones de las distintas formas de nitrógeno en el lixiviado y en el agua subterránea fueron:

	Lixiviado	Agua subterránea
Amonio (mg/l)	109-370	0-48
Nitrato (mg/l)	9-11	0-6.3
Nitrito (mg/l)	0	0-0.02

Como puede deducirse de estos datos, la principal contaminación de nitrógeno del agua subterránea por los lixiviados es en forma de amonio, pero dado que se encuentra en un medio oxidante éste pasará fácilmente a nitrato.

- **Contaminación por aguas residuales.**

Muchos ríos están muy contaminados como consecuencia de los vertidos de aguas residuales, muchas veces con tratamientos elementales o inadecuados, o sin tratamiento. Estos ríos en el caso de ser perdedores, lo que es frecuente en zonas áridas y/o en regiones con acuíferos de permeabilidad muy alta como son los de naturaleza cárstica o con formaciones basálticas recientes, producen una contaminación directa a los acuíferos (Sahuquillo Herráiz, 1999).

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). Como es lógico un agua de abastecimiento se enriquecerá en Nitrógeno al verterse como agua residual. El uso de este agua para riego del campo, diluida o no, o bien su vertido directo parece ser causa de un enriquecimiento en Nitrógeno de un acuífero, especialmente en NH_4^+ .

La Directiva 91/271 de la U.E. obliga a las poblaciones superiores a 2000 h-eq. de los países miembros a tratar sus aguas residuales al menos con un tratamiento biológico e indicar las características del vertido en lo que respecta a la DBO_5 , DQO y SS, haciendo

referencia a los nutrientes sólo en caso de vertido a zonas sensibles. Para realizar el vertido en dichas zonas se exige un porcentaje mínimo de reducción de un 80% de fósforo total y de un 70-80% de nitrógeno total, referente a los nutrientes.

Según el Real Decreto 509/1996, que desarrolla el Real Decreto-ley 11/1995 (trasposición al ordenamiento jurídico interno de la Directiva 91/271), se considera zona sensible a un medio acuático si puede incluirse en uno de los siguientes grupos:

- a) Lagos, lagunas, embalses, estuarios y aguas marítimas que sean eutróficos o que podrían llegar a ser eutróficos en un futuro próximo si no se adoptan medidas de protección.
- b) Aguas continentales superficiales destinadas a la obtención de agua potable que podrían contener una concentración de nitratos superior a la que establecen las disposiciones pertinentes del Real Decreto 927/1988, de 29 de Julio.
- c) Masas de agua en las que sea necesario un tratamiento adicional al tratamiento secundario para cumplir lo establecido en la normativa comunitaria.

Los tratamientos biológicos exigidos son procesos de oxidación por lo que el Nitrógeno presente en el agua residual se transformará mayoritariamente en NO_3^- (forma más oxidada del Nitrógeno).

El agua residual fue siempre demandada para su uso en el riego y hoy en día crecen las políticas de reutilización de este agua tras su tratamiento para diversos usos, como el riego en agricultura, recarga de acuíferos, riego de parques y jardines, etc.

Los principales tratamientos que se le realizan al agua antes de su reutilización y tras un tratamiento secundario son una filtración previa coagulación y una desinfección. Cuando este agua se emplea en el riego sobre todo para agricultura no se eliminan los nutrientes que por otro lado tienen un efecto positivo para los cultivos. El empleo de este

agua puede por ello enriquecer un acuífero en NO_3^- , sin embargo su empleo como sustituto de los fertilizantes descendería el grado de contaminación.

- **Contaminación por prácticas agrícolas.**

En los últimos años se han alcanzado grandes progresos en la identificación y caracterización de los elementos contaminantes, lo cual ha dado lugar a nuevas tecnologías que eviten la contaminación. En esta línea muchos de los problemas causados por la industria o los municipios se acometen con éxito, sin embargo aquella procedente de la agricultura no se ha tratado con la misma intensidad, siendo hoy día uno de los principales focos de contaminación difusa.

En las últimas décadas se ha producido una evolución acelerada en los métodos de cultivo debido al empleo de fertilizantes, mecanización agraria, genética y aplicación de pesticidas. Todo esto se ha traducido en un crecimiento en la producción agrícola, así como en su calidad, suponiendo también un menor coste. Siguiendo estos criterios y alentados por fabricantes y distribuidores, los agricultores han creído que mayor dosificación, sobre todo en fertilizantes, daría un mayor rendimiento.

Es cierto que el uso de fertilizantes químicos aumenta la producción (ECETOC, 1988) pero también es cierta la existencia de un punto óptimo a partir del cual el rendimiento no mejora sino que incluso puede descender (Ramos, 1987). Este exceso en el uso de fertilizantes se traduce en un mayor arrastre de NO_3^- en los lixiviados convirtiéndose en un importante aporte de Nitrógeno a las aguas subterráneas, produciéndose la contaminación por nitrato de las mismas (Paramasivan, *et al*, 1997).

El sector agrícola es básico para el desarrollo de una sociedad, esto hace que se trabaje en la línea de la producción de alimentos desarrollando este sector. Hoy día solo una pequeña parte de la población en los países desarrollados se dedica a la agricultura, gracias a la intensificación de ésta, lograda mediante aportes externos como son abonos orgánicos,

fertilizantes, plaguicidas, energías etc. Estos aportes han sido claves para intensificar la producción, sin embargo llevan consigo una serie de efectos indeseables para el medio, por lo que deben emplearse juiciosamente (Prasad, 1999).

Cualquier sistema de producción agrícola, lleva consigo una gestión adecuada de nutrientes, sobre todo P y N, esenciales para el desarrollo de cualquier ser vivo. En este sector, como en cualquier otro de tipo industrial, se pretende obtener a partir de un aporte inicial de nutrientes la máxima obtención de alimento, estableciendo así una transferencia de estos nutrientes que evite las fugas del proceso y por lo tanto los efectos contaminantes. Esta tarea en la agricultura es prácticamente imposible, al tratarse de un sistema abierto que se puede ver afectado por la climatología o la variabilidad de las características del suelo, medio básico para la producción agrícola.

Todo esto trae como consecuencia el aporte incontrolado de sustancias al medio, con el único objetivo de obtener la máxima producción. Esta tendencia está alentada por las diferentes industrias productoras de compuestos agrícolas, así como por la falta de educación ambiental de los agricultores, lo cual trae como consecuencia inmediata la contaminación.

Junto con otros efectos negativos no menos graves, son los aportes incontrolados de fertilizantes y plaguicidas los que convierten a las actividades agrícolas en focos contaminantes. De entre los diferentes compuestos aportados al medio agrícola, destaca el nitrógeno como elemento que presenta efectos negativos más inmediatos. Este compuesto, con nueve estados diferentes de oxidación, fácilmente se transforma en nitrato, en el suelo bien oxigenado, sustancia que por su alta solubilidad se elimina fácilmente del medio donde se aportó, alcanzando masas acuosas tanto superficiales como subterráneas.

En la segunda guerra mundial se logró obtener nitrato mediante síntesis. Inicialmente se obtenía con fines bélicos, pero tras el final de la guerra encontró su salida como fertilizante, transformándose la industria para este fin. A partir de esta época el

consumo de fertilizantes nitrogenados se dispara, llegando a multiplicarse su consumo en Europa cien veces desde 1955 (Sanchís Moll, 1990).

Existen discrepancias entre el grado de contaminación causado por los aportes de nitrógeno al suelo, así como por sus beneficios. Lógicamente el aporte de fertilizantes nitrogenados da lugar a un incremento en la productividad, sin embargo este aumento no es directamente proporcional, asegurando algunos autores que existe un punto crítico de efectividad de consumo de fertilizantes, lo cual no justifica una aportación incontrolada, unido a los problemas de salud y del medio ambiente, tal y como se probó en Filipinas (Lucas, *et al*, 1999). En general todos los autores están de acuerdo en que el exceso de fertilización química, así como su defectuosa aplicación, son las principales causas de contaminación de aguas por nitrato (Prasad, 1999).

Ante estas evidencias surgen normativas que regulan las aportaciones de nitrógeno en el medio agrícola (D. 91/676 UE), planteando como solución al problema evitar aportaciones excesivas. Esta solución que se ha puesto en marcha en diversos países, es una apuesta de futuro que no siempre es posible llevar a cabo y que no plantea una solución inmediata a un problema de contaminación difusa de las aguas subterráneas.

- **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 y almidón. A esta lista se le pueden añadir otras como madereras, papeleras, fertilizantes, productos químicos, hierros o curtidos. Dentro de todas ellas destacarían las destilerías llegando a valores de 1900 mg de NO_3^- / l en sus vertidos o los mataderos que pueden llegar hasta 1500.

A pesar de estos altos valores, raramente se han dado casos de contaminación puntual de acuíferos por un vertido industrial de NO_3^- , pero sí hay que destacar que al verse a la red de alcantarillado este Nitrógeno se aportará al agua residual.

- **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 contenido por los lixiviados, sobre todo cuando se realiza en exceso. Casos como estos fueron descubiertos en los ríos de Gales por Knappert y Oskam (1987).

En la región Pampeana de Argentina, la contaminación por nitrato del agua subterránea provocada por el sector ganadero es muy importante. En un muestreo realizado en la zona, se detectaron nitratos en un 92,85% de los pozos, no siendo apta para consumo humano el agua en un 50% de los casos. Las fuentes de contaminación son principalmente corrales de animales, lotes agrícolas fertilizados y huertas (Herrero, *et al*, 2000).

- **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 NO_3^- / l en el acuífero por su origen mineral.

I.1.2.- Grado actual de contaminación de los acuíferos

El origen del importante problema de la contaminación de acuíferos por nitratos, tal y como se ha indicado en el apartado anterior, se atribuye a la agricultura (aplicación de fertilizantes) y a la ganadería; aunque en menor medida también los vertidos líquidos urbanos son fuente de compuestos nitrogenados, si bien sus consecuencias suelen ser más restringidas y localizadas en el entorno próximo a los puntos de vertido.

El grado actual de contaminación de acuíferos por nitratos en España se puede clasificar del siguiente modo (Libro Blanco del Agua en España, 1998):

- El litoral mediterráneo presenta una contaminación por nitratos muy importante, siendo especialmente acusada en el Maresme, con valores superiores a los 500 mg/l, y en grandes áreas de las planas costeras del Júcar (Castellón y Valencia), donde se superan los 100 mg/l.
- Entre las unidades interiores, la Llanura Manchega, el aluvial del Ebro y algunos sectores del valle del Guadalquivir (aluviales del Guadalquivir y Guadalete) son las más afectadas, con contenidos entre 50 y 100 mg/l de nitratos.
- De forma local la presencia de nitratos afecta a diversas áreas de las cuencas del Duero (región central del Duero, Esla-Valderaduey y Arenales), Tajo (La Alcarria, Tiétar y Ocaña), Sur (Campo de Níjar, Dalías y Fuente Piedra), y Segura (Campo de Cartagena, Guadalentín, y Vegas del Segura)..

En la figura adjunta (Fig. I.1.) se muestran puntos de la red de control indicándose si el contenido de nitratos es mayor o menor de 50 mg/l. Como puede verse, el problema no es generalizado en todo el país, pero la gravedad de la situación en algunas zonas, en las que se usa esta agua con destino a abastecimientos (como sucede en la Vega granadina),

requiere de la mayor atención por parte de los usuarios y de las Administraciones públicas concurrentes.

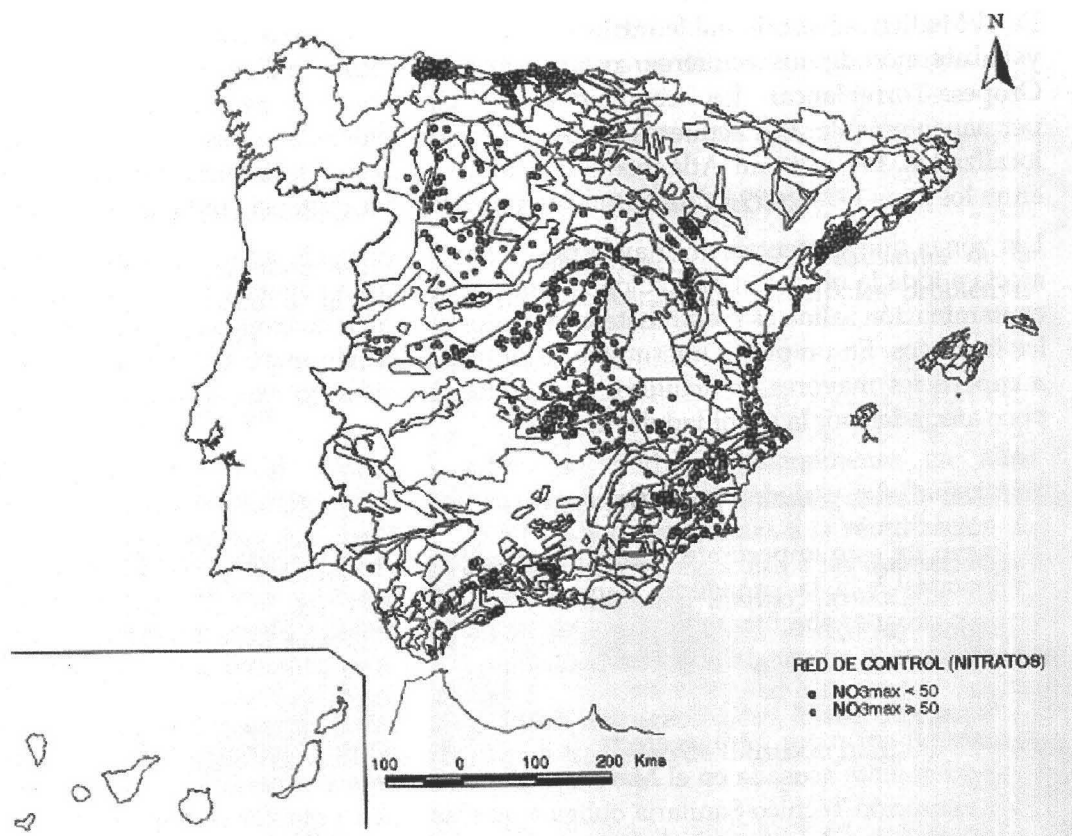


Figura I.1.: Mapa de puntos de la red de control con presencia de nitratos

(Fuente: Libro Blanco del Agua en España).

En la comarca de Osona, situada en el extremo nor-oriental de la Depresión Central catalana y entre el Prepirineo y la Sierra del Pre-Litoral, se estudió el grado de contaminación por nitratos de las fuentes más frecuentadas y de algunos pozos de los diferentes municipios. Los valores oscilaron entre los 0 mg/l de aguas de fuentes alejadas y protegidas de cultivos, poblaciones y explotaciones ganaderas, hasta 326 mg/l del agua de un pozo de las Masies de Voltregá. En 76 casos, lo cual supuso un 63% de las muestras analizadas, se superó la concentración máxima admisible de nitratos. Así pues, se observa como los nitratos son una fuente importante de contaminación en Osona, estableciéndose su

relación con la aplicación de purines y la deficiente eliminación de las aguas residuales ganaderas (Prat i Botill, 2000).

Algunos ejemplos de la contaminación en Andalucía son los siguientes:

- En el estudio de la contaminación difusa en el acuífero de la depresión de Baza debida al uso de fertilizantes y plaguicidas, se observa que las aguas subterráneas contienen un valor medio de 10-15 mg/l de nitratos en aquellos sectores del sistema acuífero menos afectados por actividades antrópicas. Sin embargo, el contenido en ión nitrato se encuentra en torno a los 80 mg/l sobre las terrazas aluviales del cuaternario, debido tanto a las actividades agrícolas como a la utilización de efluentes urbanos para riego en dicha zona (Hidalgo, *et al*, 1995).
- Según Delgado, et al (1991), en el estudio del estado de las captaciones subterráneas para abastecimiento en el sector noroccidental de la provincia de Granada, se observó que un porcentaje significativo (28%) de las muestras de agua para abastecimiento urbano analizadas superan los 50 mg/l de contenido en ión nitrato, con valores que oscilan entre 50 y 168 mg/l. La causa principal que ha motivado este exceso de nitrato es la filtración de aguas residuales urbanas. Otro foco potencial de contaminación, también significativo, es el derivado de actividades agrícolas. Otros focos que influyen en el deterioro indicado en las aguas de abastecimiento son los efluentes de carácter orgánico procedentes de actividades industriales (vertido de alpechines) o ganaderas (acopios de estiércol, vertidos de granjas, etc.).
- En el acuífero de Vélez, situado a unos 25 km al Este de la ciudad de Málaga, en la comarca de la Axarquía donde existe una intensa actividad agrícola, el deterioro de la calidad del agua para consumo humano se debe fundamentalmente al incremento del contenido en nitratos experimentado entre

1985 y 1994. La mayor concentración se alcanza en el área central del acuífero (307 mg/l), objeto de un intenso aprovechamiento agrícola, con fuertes aportes de abonos nitrogenados y riego por inundación (García, *et al*, 1996).

- En el Campo de Dalías, próximo al extremo suroriental de Andalucía, en la provincia de Almería, entre las cuencas vertientes de los ríos Adra y Andarax, existen en la actualidad unas 17.900 hectáreas de cultivos bajo plástico y unas 3.500 al aire libre. La evolución temporal de los contenidos en nitratos en esta agua es creciente en los niveles acuíferos profundos, debido principalmente al uso de fertilizantes para la agricultura intensiva de la comarca (Jiménez, R., *et al*, 1996).
- El acuífero de Ayamonte (Huelva) tiene una concentración media de nitrato superior a los 50 mg/l, alcanzándose valores locales cercanos a los 400 mg/l, problema de considerable importancia si se tiene en cuenta que este acuífero abastece de agua a 150.000 habitantes y a 9.000 hectáreas de tierras de cultivo (Grande, *et al*, 1996).

La contaminación de acuíferos por nitrato no es un problema que afecte solamente a España, sino que se extiende a otros países de Europa y del resto del mundo, siendo múltiples las referencias encontradas en revistas internacionales de dicho problema:

- En Ontario (Canadá), donde un 30% del agua es de procedencia subterránea, se comprobó que un 14% de los pozos contenían nitrato en concentraciones por encima del valor límite admisible (Goss, *et al*, 1998). Esta contaminación se asoció principalmente con la agricultura (Rudolph, *et al*, 1998).
- En áreas rurales de Quebec, la contaminación del agua subterránea por nitratos es un problema relacionado con la proliferación del empleo de los fertilizantes

químico por los agricultores y, en menor medida, a los efluentes de agua residual doméstica (Levallois, *et al*, 1998).

- Las concentraciones de nitrato en el agua subterránea han incrementado, excediendo en ocasiones el máximo permitido para la salud, durante los últimos 50 años en Tulare County, California (Zhang, *et al*, 1998). La causa principal es la agricultura.
- De igual forma, se examinó la calidad del agua subterránea en la cuenca de Sierra Pelona, California, comprobándose que un 42% de los pozos muestreados contenían concentraciones de nitrato superiores al máximo permitido para agua potable (Williams, *et al*, 1998).
- En un estudio realizado en los EE.UU., a nivel nacional, del peligro de los nitratos en el agua subterránea, se observó que en los acuíferos calificados de alto riesgo (por las características del terreno, densidad de población, cantidad de fertilizantes empleados en la zona, etc.) un 25% de los pozos excedía el nivel máximo de contaminación permitido (Nolan, *et al*, 1997). Estudios posteriores de la calidad del agua en el período 1992-95 demostraron que en 4 de los 33 acuíferos mayores empleados como fuente de agua potable en EE.UU., tenían una concentración de nitrato superior al máximo permitido para agua potable (Nolan, *et al*, 2000); concretamente en Texas hay 9 condados donde más del 50% de las observaciones excedieron el nivel máximo (Hudak, 2000).
- Las concentraciones crecientes de nitrato en el agua subterránea son un tema de importancia en Alemania, encontrándose la causa principal en el incremento de empleo de fertilizantes comerciales: se ha pasado de 27.4 kg/ha en 1951 a 107.8 kg/ha en 1990 (Vanderploeg, *et al*, 1997).



- En India, país en desarrollo, la aplicación de fertilizantes químicos y pesticidas es todavía bajo en comparación con los países desarrollados, pero con la introducción de la agricultura intensiva y la adopción de técnicas modernas de cultivo, existen áreas importantes, tales como Punjab y Haryana, donde se detectan altas concentraciones de nitrato en el agua subterránea (Agrawal, 1999).
- En la zona Central del Valle de Chile, la contaminación de nitrato del agua subterránea debido a la agricultura, es evidente según indica Donoso, *et al*, 1999.

I.1.3.- Problemas sociales desencadenados

Las regulaciones establecidas por la legislación en cuanto a la presencia de compuestos nitrogenados en el agua potable, así como las limitaciones establecidas en las aportaciones de estos compuestos al medio, tienen su origen en los efectos adversos que causan, tanto al medio natural (eutrofización) como para la salud pública.

I.1.3.1.- Patologías

Se puede fijar la fecha de 1895 como la primera descripción de un caso mortal por ingesta de nitrato (Gómez, 1998). La muerte de ejemplares de ganado bovino por la ingesta de grandes cantidades de maíz verde fue debida 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, iniciando una larga controversia sobre la toxicidad del nitrato. Esta inquietud se 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, muchos otros 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 el cáncer de estómago causado 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 le 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 (Fritsch, 1982). Se absorben rápidamente a nivel intestinal, una pequeña parte se recicla a nivel enterohepático y salivar y se eliminan rápidamente por vía urinaria. 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, por lo que un exceso de nitrato le puede producir la muerte, tras una masiva formación de nitrito, por methemoglobinemia.
- Los bebés hasta los cuatro meses (Klaassen *et al*, 1986).

El síndrome de los niños azules (metahemoglobina) está relacionado con la ingestión por nitrato (Doyle *et al*, 1985). Este anión se transforma en nitrito, por la acción

de bacterias reductoras de nitrato en el intestino, el cual reacciona con la hemoglobina de la sangre convirtiéndola en el interior en metahemoglobina, y como consecuencia de esto el oxígeno no llega a las células del organismo, causando la muerte.

La segunda enfermedad reconocida por la OMS está también relacionada con la presencia de nitrito en el estómago. Su reacción con los compuestos aminados procedentes de la alimentación da lugar a la formación de nitrosaminas, causantes de algunos tipos de cáncer de estómago (Chambon *et al*, 1983; Cantor, 1997).

I.1.3.2.- Eutrofización

Otro de los efectos negativos de la presencia de nitrato en un medio acuoso es la eutrofización o envejecimiento acelerado de lagos y embalses. La eutrofización es un proceso acumulativo de las aguas naturales con sustancias nutritivas, especialmente nitrógeno y fósforo, que origina un aumento de la población de algas, un incremento de la productividad en todos los niveles de la cadena alimentaria y un empeoramiento de las características físico-químicas iniciales del agua.

Los lagos y embalses se suelen clasificar en *eutróficos*, *mesotróficos* y *oligotróficos*, de acuerdo con la capacidad de los mismos para producir una biomasa vegetal más o menos abundante.

Los eutróficos se caracterizan por tener una elevada productividad primaria y una gran concentración de nutrientes. Por regla general, son poco profundos, turbios en verano por efecto del fitoplancton, y con bajas concentraciones de oxígeno disuelto en el fondo con tendencia a la anoxia durante el período de estratificación.

Los oligotróficos tienen un contenido bajo en nutrientes, son poco productivos, transparentes, profundos y con una elevada concentración de oxígeno disuelto en el hipolimnion.

Los mesotróficos ocupan una posición intermedia entre ambos.

La eutrofización se puede acelerar por la intervención humana (eutrofización artificial). Este problema 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. Es el efecto biológico de un incremento en la concentración de nutrientes (por vertidos de aguas residuales, actividad industrial y nutrientes empleados de forma masiva en la agricultura), 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. 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.

Un embalse eutrofizado genera una serie de problemas como:

- El agua procedente de este embalse precisa de mayores tratamientos generando además una serie de problemas en el agua de abastecimiento, como formarse compuestos orgánicos halogenados (considerados como cancerígenos) con el cloro empleado en la desinfección.

- Producción de toxinas que pueden llegar al ser humano por consumo de estas aguas o por consumo de animales que las tomaron del agua.
- Limitación de uso del embalse para la pesca por la pérdida de especies económicamente importantes o pérdida de atracción de la zona para actividades recreativas.

Todos estos 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.

En la siguiente figura (Fig. I.2.) se representan las proporciones de los volúmenes de agua degradados (eutróficos o hipereutróficos) respecto a los volúmenes totales existentes en cada ámbito de planificación, y el porcentaje medio global (casi un 50%), en el supuesto de que el estado trófico se mantuviera a máximo embalse.

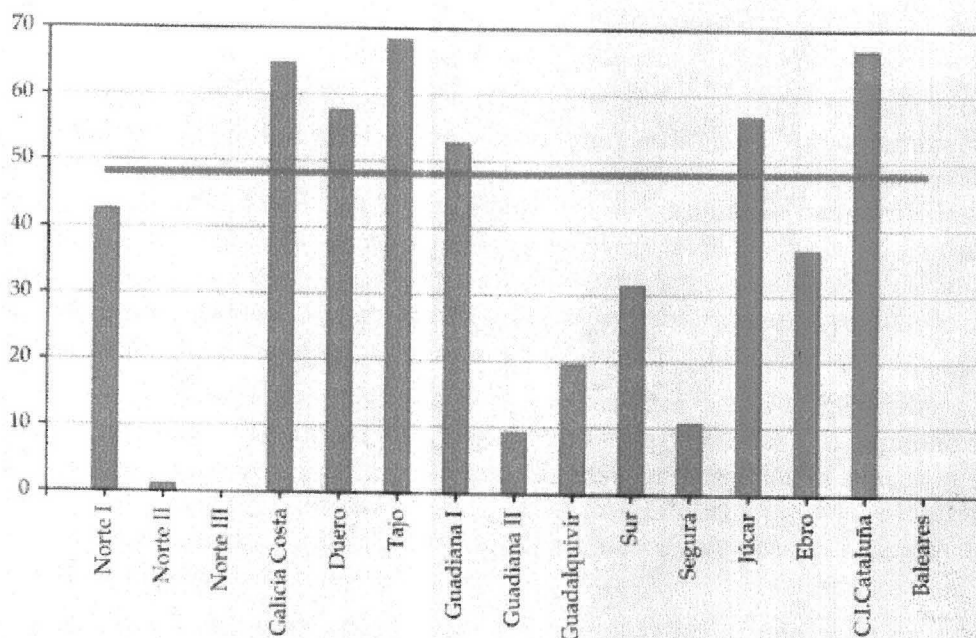


Figura I.2.: Volumen degradado con respecto a la capacidad total de embalse por ámbitos de planificación. (Fuente: Libro Blanco del Agua en España).

Como puede verse, las cuencas que presentan las aguas almacenadas en peor estado son las del Tajo (68%), Internas de Cataluña (67%), Galicia (64%) y Duero (57%), lo que lleva a que casi la mitad (el 48%) del volumen total de los embalses españoles se encuentre en estado avanzado de eutrofización.

I.1.4.- Tendencias actuales para controlar el problema de la contaminación. **Legislación.**

El problema de contaminación de nitratos es muy complicado no sólo en España, sino en toda Europa. Los rendimientos alcanzados por el agricultor le hace abusar de los nitratos, algo que ya se ha denunciado en la Escuela de Agrónomos de Córdoba. Se viene a poner 500 kilos de abono por hectárea, cuando lo recomendado es 200. El sobrante se filtra a los acuíferos. Así pues, el problema hay que atacarlo en el origen.

La protección de aguas subterráneas requiere la información hidrogeológica apropiada y adecuada para entender y analizar los procesos de contaminación. Los procesos de movimiento y transporte de los contaminantes por el agua subterránea precisan un conocimiento mucho más detallado y cuantificado del flujo subterráneo. La escala de trabajo necesita ser mucho más detallada que para los problemas de flujo, y además se debe prestar una atención especial a la zona no saturada. Igualmente será necesario establecer mejor la relación y los intercambios de flujo con las aguas superficiales (Sahuquillo Herráiz, 1999).

La conservación de la calidad de las aguas subterráneas debe regirse por el principio de *prevención*, evitando que se produzca su contaminación, estableciendo los medios y normativas que limiten el vertido incontrolado, la instalación de actividades peligrosas sin las debidas medidas de seguridad, y la aplicación indiscriminada de productos agroquímicos.

Una vez que se ha contaminado un acuífero, la recuperación de su calidad, aunque es factible, es de gran complejidad técnica y supone un elevado coste económico, lo que ha llevado comúnmente al abandono del recurso afectado y su sustitución por agua de otro origen.

Las actuaciones en el campo de la descontaminación de acuíferos se circunscriben en nuestro país al saneamiento de zonas donde se han producido derrames de hidrocarburos procedentes de depósitos de almacenamiento (gasolineras, etc.), sin que hasta el momento se disponga de información referente a la conclusión de ninguna de las acciones en marcha destinadas a la recuperación de acuíferos contaminados por otro tipo de compuestos.

Las alternativas de protección de las aguas subterráneas suelen ser tres: no degradación, limitar la degradación y protección diferencial (Sahuquillo Herráiz, 1999).

- El primero es el criterio que defienden algunas organizaciones ambientalistas radicales y es claramente utópico. Para llevarlo a cabo tendrían que eliminarse multitud de actividades, estando entre éstas la agricultura.
- La degradación limitada pretende mantener lo más alta posible la calidad del agua subterránea, admitiendo que pueda haber alguna degradación. Es una postura más realista y tiene la flexibilidad de poder exigir menos protección para acuíferos ya contaminados, aunque en cualquier caso hay que ser cuidadoso, más que permisivo.
- El criterio de protección diferencial estriba en proteger los recursos subterráneos sólo en la medida necesaria para poder satisfacer los usos presentes y futuros. Permite poner más énfasis en preservar de la contaminación a ciertos acuíferos con potencial grande, o con calidad de agua elevada, y aplicar controles más exigentes en otras zonas. Un

argumento en su contra es lo difícil que es el predecir a largo plazo las necesidades de agua de las generaciones futuras dada la persistencia natural de la contaminación en los acuíferos debido a la gran lentitud de su regeneración.

Las medidas de protección de la calidad de las aguas subterráneas contra la contaminación deben mantener un balance realista entre la protección de todo el acuífero como fuente de agua potable y contemplar a la vez las fuentes de contaminación puntuales y difusas, tener en cuenta la capacidad natural del subsuelo para atenuar a muchos contaminantes y la biodegradabilidad de otros. El no hacerlo puede ser excesivamente conservador y restrictivo para otros intereses y en consecuencia mucho más difícil y costoso de llevar a la práctica.

Se han realizado investigaciones sobre el comportamiento de los nitratos (fuente no puntual) a su paso a través del suelo y la zona no saturada, que permiten disminuir el aporte de nitratos al acuífero por la aplicación de fertilizantes de lixiviado lento y haciéndolo en las épocas adecuadas en las que se necesita para el crecimiento de las plantas.

En el Reino Unido se han declarado zonas sensibles a los nitratos y se ha animado a los agricultores de estas áreas a que acepten unos esquemas de gestión agrícola a cambio de compensaciones económicas para compensar las pérdidas de producción. La directiva de nitratos de la CE requiere la designación de área vulnerable cuando el contenido de nitratos supere 50 ppm. Esta Directiva del año 91 no se traspuso en España hasta el año 96 (Real Decreto 261/96) y está presentando dificultades de aplicación en muchos países. La colaboración de los agricultores es imprescindible para el control de la contaminación por nitratos.

La incorporación a nuestro ordenamiento jurídico interno de la Directiva 91/676/CEE se realiza con el **Real Decreto 16-2-1996, número 261/1996**: Protección contra la contaminación producida por los nitratos procedentes de fuentes agrarias.

- Este Real Decreto tiene por objeto establecer las medidas necesarias para prevenir y corregir la contaminación de las aguas, continentales y litorales, causada por los nitratos de origen agrario.

- En este Real Decreto se definen las zonas vulnerables como aquellas superficies territoriales cuya escorrentía o filtración afecte o pueda afectar a la contaminación por nitratos de:
 - a) Aguas superficiales que presenten, o puedan llegar a presenta, una concentración de nitratos superior a los límites fijados en el anexo número 1 del Reglamento de la Administración Pública del Agua y de la Planificación Hidrológica, aprobado por Real Decreto 927/1988 (RCL 1988/1825 y 1967), modificado por el Real Decreto 1541/1994 (RCL 1994/2189).
 - b) Aguas subterráneas cuya concentración de nitratos sea superior a 50 mg/l o pueda llegar a superar este límite.
 - c) Embalses, lagos naturales, charcas, estuarios y aguas litorales que se encuentren en estado eutrófico o puedan eutrofizarse en un futuro próximo.

- Los órganos competentes de las Comunidades Autónomas elaborarán uno o varios códigos de buenas prácticas agrarias (Anejo 1), que los agricultores podrán poner en práctica de forma voluntaria, con la finalidad de reducir la contaminación producida por los nitratos de origen agrario.

- En las zonas designadas como vulnerables, los órganos competentes de las Comunidades Autónomas establecerán programas de actuación (Anejo 2) con objeto de prevenir y reducir la contaminación causada por los nitratos de origen agrario.

- Las cantidades máximas de estiércol aplicadas al terreno se indican en el Anejo 3 del Real Decreto.
- Se especifican las características de los puntos de muestreo, los métodos y frecuencia de las tomas de muestra (Anejo 4).
- Por último, se indica que será necesario elaborar un informe de situación que se comunicará a la Comisión Europea periódicamente, para comprobar el grado de cumplimiento de la Directiva. El contenido que deberá figurar en dicho informe se indica en el Anejo 5.

En esta línea de control de contaminación de acuíferos producida por nitratos, se ha desarrollado un Programa de Prácticas de Mejor Gestión (BMP) de empleo de fertilizantes en agricultura. Analizando los costes - beneficios de la implementación de dicho programa, se ha comprobado que los costes igualarán a los beneficios en un período de 4-5 años, por lo que será más efectivo reducir la contaminación producida por nitratos que buscar fuentes alternativas de agua potable (Yadav, *et al*, 1998).

I.2.- TECNOLOGÍAS ACTUALES PARA ELIMINAR EL NITRATO DEL AGUA SUBTERRÁNEA

La solución inmediata para emplear las aguas subterráneas contaminadas con nitrato en la obtención de agua potable, consiste en una reducción de las concentraciones de nitrato y nitrito bajo los límites establecidos por la legislación (R.D. 1138/90). El tratamiento del agua o bien su dilución con otros recursos hídricos, siempre que sea posible, son en ocasiones las únicas opciones para poder obtener agua potable en muchas zonas del planeta, sin embargo estas opciones se encuentran con grandes dificultades económicas, difíciles de solventar, que obligan a una población a no poder disponer de un recurso que cuente con las mínimas exigencias de salubridad. Esta problemática demanda una tecnología viable tanto técnica como económicamente, que permita solucionar el problema de forma puntual, dotando a una población de agua de abastecimiento sin que esto suponga un alto coste económico.

La eliminación de solutos de un medio acuoso puede llevarse a cabo por una diversidad de procesos de naturaleza tanto física, química como biológica. Electrodiálisis, destilación, adsorción por carbono activo, intercambio iónico u ósmosis inversa (Sheng and Chang, 1996; Dahab *et al*, 1991; Huang *et al*, 1998; Bohdziewicz, *et al*, 1999, Gómez *et al*, 2000) son algunas de las tecnologías aplicables para la reducción de la concentración de nitrato del agua, sin embargo no todas son viables a nivel económico, planteando algunas de ellas problemas cuya solución es más problemática que el caso de contaminación solucionado.

Los procesos químicos consisten en hacer reaccionar el compuesto a eliminar con un determinado reactivo que facilite la precipitación, procesos que a nivel del nitrato, aunque son técnicamente viables (compuestos como el AgNO_3 son insolubles), la naturaleza y coste del reactivo apropiado no los hacen adecuados. A este nivel se han ensayado otros procesos como la reducción química ayudada de catálisis. Este proceso se realiza en presencia de hidrógeno y catalizado por metales mono y bivalentes (Pintar, *et al*

1998), empleando principalmente Pd, procesos que eliminan de forma selectiva nitrito. Reddy y Lin (2000) estudiaron el proceso de reducción catalítica para eliminar nitrato con tres catalizadores diferentes, paladio (Pd), platino (Pt) y rodio (Rh) en carbono (5-10%), resultando el rodio el más efectivo en la eliminación de nitrato. Otros autores como Hörold *et al* (1993) y Pintar *et al* (1998) encontraron que el proceso realizado con Pd sobre base de Al en diferentes proporciones ofrecía mayores ventajas, minimizando incluso el principal problema presentado por esta tecnología, como es la acumulación de NH_4^+ . Estos trabajos, ponen de manifiesto la disponibilidad de una nueva tecnología posiblemente aplicable en la eliminación de compuestos de nitrógeno de aguas contaminadas, sin embargo aun quedan por concretar muchos pasos para lograr su aplicación industrial.

Dentro de los **procesos de naturaleza físico-química** se encuentra el **intercambio iónico** (Sata and Nojima, 1999) empleando membranas que presentan resinas con grupos polares, las cuales permiten la eliminación de aniones de diversa naturaleza como nitrato, sulfato, bromo o flúor, cambiándolos normalmente por cloruro. Estos sistemas son efectivos en cuanto a la eliminación de aniones del medio, sin embargo pueden plantearse problemas sobre las membranas causados por diversas sustancias que las degradarían (Liang, *et al*, 1999). Junto con la biodesnitrificación, estos procesos han sido considerados como los más adecuados (Clifford and Liu, 1993), tanto a nivel técnico como económico (referido únicamente a los costes de inversión), sin embargo presentan una serie de inconvenientes importantes en su aplicación:

- la regeneración de las membranas, con alta adición de cloruros;
- la obtención de salmuera de rechazo con serias dificultades para su vertido;
- la adición de cloruros al agua de consumo;
- la baja selectividad de estos sistemas por el nitrato;

- la necesidad de realizar el registro sanitario de las resinas utilizadas, requisito necesario para el abastecimiento humano.

Otro grupo importante de **procesos son los de naturaleza física** entre los que se encuentra la *evaporación mediante calor*, proceso cuya tecnología ha mejorado considerablemente en los últimos años, pero que precisa un gran aporte energético para evaporar el agua, lo cual lo hace menos competitivo frente al resto de procesos. En este grupo se pueden considerar los procesos de membrana como es el caso de la *ósmosis inversa*, tecnología que presenta un gran auge en los últimos años, en los cuales se ha mejorado de forma considerable (Bohdziewicz, 1999). Estos sistemas precisan de un gran aporte energético para eliminar sales de un medio acuoso, sin embargo sus valores se reducen al tratar aguas cuya concentración salina precisa una menor presión para superar la osmótica, como es el caso de las aguas subterráneas. Los tratamientos en estos casos se realizarán solo sobre una porción del agua, mezclándola nuevamente con el efluente principal, lo cual evita una remineralización. A pesar de estas reducciones energéticas, la no selectividad del proceso y la obtención de salmuera de rechazo vuelven a ser problemas para su aplicación.

Otro proceso de membrana que se presenta como tecnología viable es la *electrodialisis* (Hell, 1998) la cual no precisa apenas de aplicación de reactivos y elimina de forma no selectiva aniones y cationes mediante la aplicación de una corriente eléctrica, cuyo voltaje dependerá de la concentración salina del efluente a tratar. Entre sus desventajas se encuentran problemas semejantes a los indicados para los procesos anteriores, como la no selectividad del proceso y la obtención de salmuera de rechazo.

Frente a estos sistemas aparecen los **procesos biológicos basados en la biodesnitrificación**, los cuales son los únicos selectivos tanto para NO_3^- como para NO_2^- y

permiten eliminar los compuestos nitrogenados contaminantes, transformándolos en gas nitrógeno, un compuesto inerte mayoritario en la atmósfera (Lazarova *et al*, 1994).

De todos los procesos indicados tan solo **la ósmosis inversa, el intercambio iónico y la biodesnitrificación** son actualmente viables a nivel de instalación a tamaño industrial; ya que los procesos químicos suelen ser incompatibles con las limitaciones establecidas en la Reglamentación Técnico Sanitaria, principalmente por los aportes de metales. La evaporación mediante calor precisa de un gran aporte energético por lo que los costes de explotación son tan elevados que no es competitiva con el resto de procesos, y la electrodiálisis presenta bajos rendimientos y múltiples problemas asociados a otros compuestos presentes en el agua bruta.

En cuanto a los tres procesos viables a nivel de instalación industrial es difícil establecer una comparativa detallada en costes de inversión y costes de explotación debido a la escasa aplicación de estos sistemas para la eliminación de nitrato de aguas subterráneas contaminadas. En países como E.E.U.U. no se ha aceptado muy bien la aplicación de procesos biológicos para el tratamiento de aguas destinadas al abastecimiento, por lo que la tecnología de la biodesnitrificación no se ha llevado a escala industrial en esta zona. Esto si se ha realizado en Europa, pero son pocas las instalaciones puestas en marcha (Dahab *et al*, 1991; Rogalla, *et al*, 1990). Procesos como el intercambio iónico si son más aceptados en América donde se conocen dos plantas destinadas a la eliminación de nitrato (Dahab *et al*, 1991; Guter, 1987), mientras que la ósmosis inversa es la tecnología que más se aplica en la actualidad para este fin.

En el caso de la ósmosis inversa, los costes de inversión para una planta de tamaño medio (hasta 10.000 m³/día) se pueden considerar en torno a las 120.000 pts/m³/día. Referente a todo el conjunto de la potabilización, los costes de explotación oscilan entre las 40 y 60 pts/m³ dependiendo del tamaño de la instalación dentro del rango intermedio, excluyéndose los costes de amortización de las instalaciones, y considerando igualmente

todas las etapas del tratamiento para potabilizar el agua, no sólo las de eliminación de nitratos.

El nivel de inversión del intercambio iónico es inferior al de la ósmosis inversa, pero los costes de explotación suelen ser superiores, aunque las desviaciones no suelen ser importantes ni en inversión ni en explotación frente a la ósmosis.

La gran ventaja de la ósmosis inversa frente al intercambio iónico es que no precisa regeneración, por tanto no se añaden más sales al medio (cloruros), y permite eliminar materia orgánica precursora de trihalometanos. Entre el intercambio iónico y la ósmosis inversa es esta última tecnología la que está siendo más desarrollada e implantada.

El tratamiento biológico a nivel de inversión exclusivamente del proceso de eliminación de nitratos requiere menor capital que los dos anteriores, sin embargo, teniendo en cuenta el proceso completo de potabilización, la inversión total dependerá del tratamiento posterior necesario según la calidad global del agua tras la biodesnitrificación. El principal problema de esta tecnología es el aporte de microorganismos y restos orgánicos al agua tratada, lo cual obliga a tratamientos posteriores y por lo tanto a un incremento en el coste de instalación de la tecnología (Clifford and Liu, 1993). Desde el punto de vista de la explotación, el tratamiento biológico requiere en principio menos recursos tanto energéticos como de reactivos, representando el consumo de fuente de carbono el principal gasto de explotación del sistema.

I.2.1.- Procesos físico-químicos

Las membranas de intercambio iónico son intercambiadores iónicos en forma peculiar. Hay dos tipos básicos:

- Membranas de intercambio catiónico.
- Membranas de intercambio aniónico.

Las membranas de intercambio iónico son selectivas, en tanto que son permeables a los cationes pero no a los aniones, o viceversa (Schoeman, J.J., 1998). Las cadenas de polímero están entrelazadas y tienen también enlaces cerrados en varios puntos. Los iones positivos se muestran dispersos libremente en los huecos entre las cadenas, sin embargo, las cargas negativas fijas de las cadenas repelen a los iones negativos que tratan de penetrar en la membrana y los excluyen. Así pues, a causa de las cargas negativas fijas, los aniones no pueden permear la membrana, pero sí los positivos. Si hay cargas positivas agregadas a las cadenas de polímeros en vez de cargas fijas negativas, se consigue la selectividad para las cargas iónicas negativas.

La selectividad por sí misma no es suficiente para hacer un intercambio iónico de membrana que sea práctico para un proceso de bajo coste. Adicionalmente, la resistencia de la membrana a la transferencia iónica debe ser baja. Para disminuir la resistencia, se disminuye el grado de entrecruzamiento, de modo que aumenten las distancias medias inter-cadenas y las longitudes de segmento de polímero que están libres para moverse. Sin embargo, si este aumento de los espacios vacíos entre las cadenas de polímero se lleva lejos, puede dar por resultado unos volúmenes en el centro de los huecos que no están afectados por las cargas fijas de las cadenas (el efecto de repulsión de las cargas fijas disminuye rápidamente con la distancia). Los volúmenes que no son afectados por las cargas fijas dan como respuesta una repulsión no efectiva de los iones no deseados y una selectividad disminuida. Por esta razón, debe haber un compromiso entre selectividad y baja resistencia. Las membranas disponibles en la actualidad combinan una excelente selectividad con una baja resistencia, alta resistencia física y tiempos de vida largos.

Los reactores con membranas de intercambio iónico se pueden emplear para concentrar, purificar y convertir electroquímicamente sustancias químicas en solución acuosa, todo ello de forma simultánea y selectiva; de ahí que las aplicaciones más importantes incluyan la separación de sales (recuperación de ácido y álcali de una solución de sales), eliminación de contaminantes y recuperación de fluidos de proceso.

Estos reactores tienen, en general, costes de inversión y explotación elevados con respecto a otras tecnologías existentes, por lo que deben ser adoptados sólo cuando los requisitos de pureza del producto justifiquen el sobre coste. El proceso es económicamente interesante cuando los productos recuperados son de un valor suficientemente alto, o cuando la eliminación de ciertas impurezas permite conseguir un fluido tratado apto para procesos adicionales o para descarga (Wadley and Buckley, 1998).

I.2.2.- Procesos físicos

Dentro de los procesos físicos se encuentran los procesos de membrana (ósmosis inversa y electrodiálisis), siendo las siguientes, las diferencias básicas entre ambos procesos (Pérez Talavera, 2000):

- La ósmosis inversa es un proceso de hiperfiltración (el agua de alimentación se concentra en sales al paso por el sistema, saliendo como concentrado, siendo el producto el resultado de la hiperfiltración), mientras que la electrodiálisis es un proceso de desalinización (el agua de alimentación pierde sus sales disueltas al paso por el sistema saliendo como producto).
- La ósmosis inversa usa energía de presión para el proceso, mientras que la electrodiálisis usa energía eléctrica de forma directa.
- Las membranas de ósmosis inversa a base de poliamida aromática requieren aguas de alimentación reductoras, al ser su tolerancia a los agentes oxidantes muy reducida, mientras que las membranas de electrodiálisis permiten el uso en continuo de aguas adicionadas de oxidantes, con niveles de cloro libre de 0,3 mg/l y choques de limpieza en caso de contaminación orgánica de muchas decenas de mg/l de cloro libre.



- En la ósmosis inversa al circular el agua salobre entre dos membranas adecuadas, se consigue el transporte de agua a su través debido a un gradiente de presión y queda una salmuera más concentrada en sales; en la electrodiálisis al circular el agua salobre entre una membrana de intercambio aniónico y otra de intercambio catiónico, se consigue el transporte de los aniones a través de la primera y de los cationes a través de la segunda debido a un gradiente de potencial eléctrico, quedando un agua más diluida en sales.

La electrodiálisis está basada en una diferencia de potencial eléctrico y requiere la utilización de membranas conductoras de la corriente eléctrica que son membranas densas o microporosas de naturaleza semejante a las resinas de cambio iónico pero moldeadas en forma de láminas. Es una operación por la cual los iones son dirigidos a través de membranas selectivas bajo la influencia de una diferencia de potencial eléctrico. Alternando las membranas selectoras catiónicas y aniónicas en una disposición alterna con canales finos entre ellas es posible producir canales alternantes de fluidos que están enriquecidos o faltos de iones, respectivamente. La aplicación más importante a gran escala de la electrodiálisis es la producción de agua potable a partir de aguas salobres. Más recientemente ha sido instalada la primera unidad en Italia para lograr la remoción de nitratos desde una fuente de agua subterránea (Aptel and Buckley, 1998).

La electrodiálisis reversible (EDR) es una técnica versátil de desalinización que permite controlar los elementos iónicos presentes en las aguas naturales y en las aguas contaminadas. Las aplicaciones principales de este proceso son (Arroyo, *et al*, 1991):

- Tratamiento de agua con alto contenido de cloruro de sodio, debido a la intrusión de aguas salobres en las fuentes de agua dulce en las zonas costeras, provocado por el uso desmedido de las aguas subterráneas.
- Eliminar el fluoruro en el agua en zonas que presentan una alta concentración natural de este elemento, dado que demasiado fluoruro en el agua puede producir la llamada fluorosis dental, decoloración o mancha de los dientes

- Descontaminación de fuentes de agua cruda contaminadas con sustancias químicas orgánicas y metales pesados.
- Restauración del agua subterránea en su concentración y composición original tras la aplicación de operaciones de minería.
- Concentración de desechos por ósmosis reversible.
- Tratamiento de los desechos de las torres de refrigeración.
- Eliminación de nitrato en las fuentes de agua potable. El proceso de EDR no requiere utilización de productos químicos para regeneración y tiene capacidad para alcanzar el nivel deseado de desmineralización con una operación hidráulica.
- Eliminación de nutrientes de aguas residuales tratadas para adaptarlas a las características exigidas en su posible reutilización.

La electrodiálisis se basa en dos tipos básicos de membranas: membranas de intercambio catiónico y membranas de intercambio aniónico. Las membranas de intercambio catiónico están formadas por cadenas de polímeros que contienen grupos fijos en su estructura con carga negativa, mientras los iones positivos se encuentran dispersos y libres en los huecos de las cadenas. De forma semejante, membranas de intercambio aniónico contienen grupos fijos en su estructura con carga positiva y los iones negativos se encuentran libres en los huecos de la misma. Naturalmente en cada momento se cumple la electroneutralidad de la membrana como un todo. (Camacho, 1999).

Si se considera un grupo de membranas catiónicas y aniónicas alternativamente dispuestas y separadas mediante una disolución de un electrolito y se establece un campo eléctrico normal a las mismas mediante dos electrodos paralelos a ella en los extremos, los iones de la disolución de electrolito se pondrán en movimiento dirigiéndose los aniones hacia el ánodo (+) y los cationes hacia el cátodo (-). En el interior de las membranas solo los iones libres podrán ponerse en movimiento y por tanto serán los únicos responsables del transporte de la corriente eléctrica, además las membranas catiónicas, con cargas negativas fijas en la estructura repelen a los iones negativos, aniones, que tratan de penetrar en ella y los excluyen (exclusión de Donnan), lo mismo ocurre con las membranas aniónicas con respecto a los cationes. Este proceso determina que las disoluciones de electrolitos entre membranas se diluyen y se concentran alternativamente en sales.

En el proceso estándar de electrodiálisis el agua fluye entre membranas permeables catiónicas y aniónicas colocadas alternativamente, que se construyen o disponen así en un acumulador o batería. La corriente continua suministra la fuerza impulsora para la migración iónica a través de las membranas. A menudo es necesaria la adición de un ácido secuestrante en la corriente de concentrado para inhibir la precipitación de sales poco solubles (CaCO_3 y CaSO_4). Para mantener el rendimiento de la batería debe limpiarse periódicamente para eliminar incrustaciones y otras materias que ensucian la superficie de la membrana y de los electrodos. Esto se realiza por limpieza "in situ" con ácidos o bases diluidos y por desmontaje de la batería.

La electrodiálisis inversa opera sobre los mismos principios básicos del proceso estándar, sin embargo la polaridad de los electrodos se invierte periódicamente, aproximadamente de 3 a 4 veces por hora y por medio de válvulas automáticas se cambia el flujo de las corrientes diluidas y concentradas. Los iones son transferidos así en direcciones opuestas a lo largo de la membrana, lo que ayuda a eliminar incrustaciones. Tras la producción del cambio, el agua purificada producto se descarga al residuo durante 1-2 minutos, hasta que alcanza la calidad deseada. Esta operación evita la necesidad de añadir ácido y/o secuestrantes y evita también la formación de incrustaciones en las cámaras de los

electrodos debido al cambio continuo de condiciones ácidas a básicas, al mismo tiempo aumenta apreciablemente los períodos de tiempo entre limpiezas in situ y desmontajes.

Sustancias con un tamaño de partículas de aproximadamente 0,0004 a 0,1 μm (de rango iónico a macromoléculas) pueden ser eliminadas del agua con ED/EDR. El posible rango de tamaño de las especies permeables se encuentra entre 0,0004 y 0,03 μm . Los contaminantes típicos que pueden ser eliminados son: sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, arsénico, níquel, cromo, cobre, zinc, estroncio, hierro, aluminio, cloruro, sulfato, nitrato fosfato, cianuro, plata, fluoruro, cromato, acetato y conductividad (Schoeman and Thompson, 1998).

La ósmosis inversa requiere emplear membranas densas, que permiten separar partículas de 0,0001 μm . La separación se basa en el mecanismo de disolución-difusión. Es una operación de membrana en la que, por medio de una presión, el solvente de una solución se transfiere a través de una densa membrana fabricada expresamente para retener sales y solutos de bajo peso molecular. Si una solución salina concentrada está separada del agua pura por este tipo de membrana, la diferencia de potencial químico tiende a promover la difusión del agua desde el compartimiento diluido al compartimiento concentrado para igualar las concentraciones. En el equilibrio, la diferencia de niveles entre los dos compartimentos corresponde a la presión osmótica de la solución salina. Para producir agua "pura" de una solución salina, debe aplicarse una presión que sea mayor a la presión osmótica de la solución. Para obtener caudales económicamente viables debe ejercerse al menos el doble de la presión osmótica, factor responsable del alto consumo energético de estas instalaciones (Aptel and Buckley, 1998).

Desde el punto de vista industrial, en el proceso de ósmosis inversa una bomba envía la solución a tratar hacia una membrana semipermeable manteniendo permanentemente una elevada presión en uno de sus lados, con lo que una parte del solvente y una cantidad muy pequeña de soluto atraviesan la membrana. Tanto la solución que atraviesa la membrana como la que es rechazada por ella, se evacuan en continuo de sus compartimientos. El rechazo presenta habitualmente una elevada concentración de

sustancias disueltas, siendo baja la del producto o “permeado”. Una válvula de regulación situada en la tubería de rechazo controla el porcentaje de solución que es convertida en producto.

El tipo de material empleado para la fabricación de las membranas suele presentar problemas adicionales en la explotación del sistema. Son materiales colonizables y atacables por los microorganismos que pueden desarrollarse sobre ellos utilizando la materia orgánica que puede depositarse sobre la membrana. Igualmente estos materiales son muy sensibles a los oxidantes químicos, los cuales pueden degradarla. Esto obliga a tratamientos previos del agua a aplicar al sistema de ósmosis, de modo que se eliminen microorganismos y materia orgánica y a la vez que no queden restos de posibles oxidantes aplicados en los tratamientos previos.

Otro de los problemas planteados por el uso de esta tecnología es el depósito de sales sobre la membrana que por la alta presión de trabajo den lugar a incrustaciones lo que obliga a la aplicación de sustancias anti-incrustantes. Estos problemas obligan a un tratamiento previo del agua antes de someterla a la ósmosis inversa, así como obligan a l empleo de reactivos reductores que eviten la presencia de oxidantes, así como de anti-incrustantes. Todo esto sumado al alto consumo energético y a los precios de las membranas incrementa los costes totales de explotación y mantenimiento.

La ósmosis inversa funciona correctamente y permite obtener un producto a precios más competitivos que con otros procesos en el campo de la desalación de aguas, tratamiento de efluentes, en la concentración de zumos y productos lácteos, producción de agua ultrapura y la recuperación de productos de los baños galvánicos. En otros campos, como la separación y concentración selectiva de determinadas sustancias, se está en fase de investigación y desarrollo, quedando todavía mucho camino por recorrer (Fariñas, 1999).

Para una aplicación determinada, no hay siempre una decisión clara y tajante sobre qué tipo de proceso de separación de membranas se debe seleccionar. La composición química o el tamaño del material a eliminar es a menudo la clave. La ósmosis inversa se usa generalmente para eliminar componentes de un tamaño molecular próximo al del agua. La Electrodiálisis puede ser considerada para la eliminación de constituyentes iónicos cuando se requieren grandes niveles de concentración, por encima de los que normalmente son prácticos con la ósmosis inversa, donde las limitaciones de presión osmótica restringen la concentración final a alrededor del 20 por 100. La ED/EDR no suele emplearse para tratar efluentes con cantidades sustanciales de contaminantes microbianos y compuestos orgánicos disueltos; tiene importantes aplicaciones en las industrias farmacéuticas y bioquímicas (Schoeman and Thompson, 1998).

Por tanto, el proceso de separación de membranas empleado normalmente para eliminación de nitratos es la ósmosis inversa, ya que la electrodiálisis presenta bajos rendimientos.

I.3.- PROCESOS BIOLÓGICOS DE DESNITRIFICACIÓN

I.3.1.- Ciclo del nitrógeno

El Nitrógeno constituye entre un 8 y un 10% de la materia viva, siendo uno de los elementos más abundantes de la biosfera. Forma parte de los compuestos orgánicos imprescindibles para la vida como son: ácidos nucleicos, proteínas (donde destacan las enzimas) o lipoproteínas (Martínez-Toledo, 1992).

El ciclo del nitrógeno (Figura I.3.) permite conocer las diferentes formas de nitrógeno que se pueden encontrar en el medio, teniendo en cuenta factores como la presencia de O_2 , presencia de materia orgánica, tipo de microorganismos presentes en el medio, etc. Este ciclo juega un papel importante en la presencia de un nutriente que puede condicionar el estado y uso del medio.

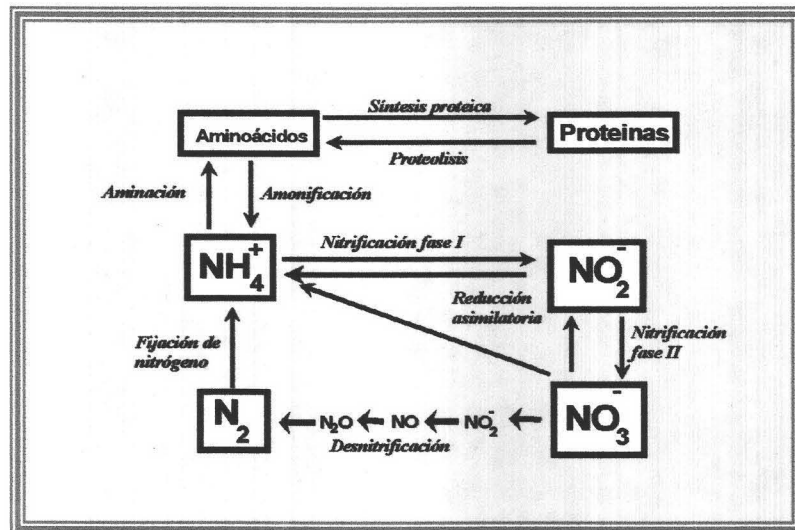


Figura I.3.- Ciclo del nitrógeno

La forma más abundante es el N_2 , presente en la atmósfera en casi un 80% (Prescott, *et al*, 1999), sin embargo esta forma no es asimilable y precisa transformarse para ello. 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 natural de nitrógeno de la biosfera y

supone aproximadamente 180 millones de toneladas al año. Este proceso biológico no es la única entrada, ya que por fenómenos naturales, como los rayos de tormentas o la luz U.V. se puede transformar el N_2 en nitrógeno asimilable, aunque en un valor que no llega a más del 0,5% del total (Martínez-Toledo, 1992).

La capacidad de fijar nitrógeno parece estar restringida a algunos organismos procariotas denominados diazotrofos (Sprent *et al*, 1987), ya que hasta hoy no ha sido descrita en ningún organismo eucariota.

Junto al proceso biológico de vital importancia para el mantenimiento del ciclo del nitrógeno, 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 nitrógeno en el medio y por lo tanto un desequilibrio en el ciclo, siendo posible causa de problemas de eutrofización o contaminación.

La asimilación de nitrógeno es la transformación del nitrógeno asimilable inorgánico (NH_4^+ y NO_3^-) a nitrógeno orgánico, proceso que pueden realizar directamente los microorganismos fijadores de nitrógeno al emplear el NH_4^+ producido, o bien los productores primarios (plantas o algas) u otros microorganismos incorporando dicho NH_4^+ o NO_3^- a moléculas orgánicas.

El empleo de NO_3^- como tal supone una reducción desasimilatoria a NO_2^- y de éste a NH_4^+ realizado por enzimas como la nitrato y nitrito reductasa asimilatorias, que aparecen en 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 NH_4^+ en el medio, sino que éste se asimila directamente.

La amonificación se puede considerar como una mineralización al transformar el nitrógeno orgánico en nitrógeno inorgánico. Esta transformación la realizan microorganismos encargados de la descomposición de la materia orgánica los cuales

emplean las macromoléculas de un organismo una vez muerto (fuente de nitrógeno orgánico) como alternativa al nitrógeno inorgánico, incorporándolo a sus estructuras celulares. Entre estos procesos se produce una desaminación que da lugar a NH_4^+ libre.

La **nitrificación** se puede definir como un proceso biológico mediante el cual el NH_4^+ pasa a NO_2^- y a NO_3^- previa oxidación. Este proceso realizado por bacterias denominadas nitrificantes, evita la acumulación de NH_4^+ en el medio, permitiendo la formación de 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. Dentro de éstas se pueden diferenciar dos grupos:

- Nitrificantes de fase I, que son capaces de oxidar el NH_4^+ hasta NO_2^- . Dentro de este grupo hay cepas pertenecientes a los géneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosovibrio* o *Nitrosolobus*.
- Nitrificantes de fase II, que son capaces de oxidar el NO_2^- hasta NO_3^- . Dentro de este grupo destacan los géneros *Nitrobacter* y *Nitrococcus*.

Dentro de los factores limitantes para la nitrificación, el principal es el oxígeno, pues sin éste no pueden realizarse 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.

La **desnitrificación biológica** completa el ciclo del nitrógeno enviando de nuevo el nitrógeno a la atmósfera en forma de N_2 . Este proceso consiste en la reducción desasimilatoria de NO_3^- y NO_2^- a los gases N_2O y N_2 (Payne, 1981) y es realizado por numerosas bacterias, principalmente heterótrofas con amplia distribución taxonómica. 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).

El NO_3^- y/o el NO_2^- son empleados como últimos aceptores de electrones en una cadena respiratoria (cuyo objetivo final es obtener energía) 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 (Thomas *et al*, 1994). Este proceso juega un importante papel en el mantenimiento del ciclo del nitrógeno, ya que se estima que mediante la desnitrificación se pueden eliminar a la biosfera $2 \cdot 10^8$ toneladas de nitrógeno al año.

Así pues, de entre los diferentes procesos que forman parte del ciclo (proteolisis, síntesis proteica, aminación, amonificación, nitrificación, reducción de nitrato, fijación de nitrógeno y desnitrificación), es la desnitrificación el que condiciona la salida de nitrógeno del medio, puesto que transforma formas oxidadas, muy solubles y por lo tanto biológicamente asimilables (NO_3^-) en un gas inerte muy abundante en la atmósfera (N_2).

I.3.2.- Desnitrificación

Este proceso descrito a mediados del siglo XIX por Smith (1867), se presentó como una amenaza para la agricultura, al ser causante de una importante pérdida de nitrógeno del suelo. Hoy día y debido a los importantes aportes que se hacen al medio de este anión y otros compuestos relacionados, se precisa de una salida que cierre de nuevo el ciclo, evitando de este modo acumulaciones de compuestos de nitrógeno, causantes de fenómenos de contaminación. La síntesis artificial de compuestos asimilables de nitrógeno, su aplicación en agricultura y otra serie de aportes artificiales al medio, son origen de contaminación que dan lugar a serios problemas medio-ambientales, sociales y económicos tales como la eutrofización de masas acuosas, la inutilización de un recurso hídrico para uso público, o en definitiva la pérdida de un uso habitual del agua.

La desnitrificación es un proceso complejo en el que intervienen numerosas enzimas con los consiguientes substratos y productos finales. El proceso es una cadena respiratoria en la que sus substratos 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 substratos en la desnitrificación, dando como producto final N_2 . Para cada fase varía el equipo enzimático empleado 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 emplear diferentes substratos y dar diferentes productos.

I.3.2.1.- Microorganismos desnitrificantes

La desnitrificación es un proceso exclusivo de procariotas, pero dentro de éstos son pocos los microorganismos capaces de respirar empleando óxidos de nitrógeno como último aceptor de electrones, aunque están ampliamente distribuidos a nivel taxonómico.

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 y suelos. Este género lo forman bacilos aeróbicos Gram negativos heterótrofos. Es frecuente también aislar *Pseudomonas* desnitrificantes de plantas como *Pseudomonas caryophylli* o *Pseudomonas solanacearum*. Otros bacilos aerobios Gram negativos aislados como desnitrificantes pertenecen a los géneros *Agrobacterium*, *Gluconobacter*, *Alcaligenes* o *Rhizobium*.

Una característica destacable de los desnitrificantes es su gran variedad morfológica, ya que no sólo hay descritos desnitrificantes entre los bacilos aerobios Gram negativos, sino que también aparecen géneros pertenecientes a los cocos Gram negativos (Jeter and Ingraham, 1981), como *Paracoccus denitrificans*.

Junto a la variedad morfológica, se une la gran variedad fisiológica, existiendo desnitrificantes entre los anaerobios facultativos, entre las bacterias del azufre, entre los termófilos o entre las bacterias fototróficas. Otros grupos fisiológicos dentro de los cuales se incluyen desnitrificantes son las bacterias deslizantes, las bacterias con apéndices o las bacterias espirales o curvadas.

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.

La capacidad desnitrificante sin embargo está ausente en otros grupos bacterianos como las Enterobacterias, las bacterias anaerobias Gram negativas, las metanogénicas, los cocos Gram positivos, las corynebacterias, actinomicetales o Rickettsias.

1.3.2.2.- Factores que afectan a la desnitrificación

La desnitrificación biológica es un proceso con cuatro componentes básicos, los cuales deben conocerse y controlarse si se quiere aplicar como un tratamiento industrial de aguas contaminadas (Payne, 1981). Estos cuatro componentes son:

- 1) Todo sistema de desnitrificación biológica necesita de un **microorganismo desnitrificante**.
- 2) Dicho microorganismo necesita de un **donador de electrones**, que en muchas ocasiones está asociado a la materia carbonada empleada. En este caso el uso de esta materia carbonada dependerá de que se trate de un microorganismo autótrofo o

heterótrofo, siendo estos últimos los desnitrificantes más abundantes en el medio. Es por ello necesaria la presencia de una fuente de carbono para que tenga lugar la desnitrificación por heterótrofos.

Este conjunto de microorganismos son capaces de emplear una amplia gama de fuentes de carbono, siendo las preferidas moléculas fácilmente metabolizables como carbohidratos, alcoholes o ácidos orgánicos (Akunna *et al*, 1993; Nurizo and Mezzanotte, 1992; Dahab and Lee, 1992; Sison *et al*, 1996). El tipo de fuente de carbono y la concentración de ésta influirán en la mayor o menor eliminación desasimilatoria de NO_3^- . En este sentido Willens *et al* (1997) describían que la mayor o menor capacidad de eliminar NO_3^- en suelos influía con la profundidad, debido principalmente a la diferente concentración de materia orgánica que hay según la profundidad del suelo.

En cuanto al tipo de fuente de carbono, Constantin y Fick (1997) destacaron una mayor actividad desnitrificante al emplear ácido acético en lugar de etanol. Esto es debido 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 tener en cuenta que no todos los microorganismos desnitrificantes son capaces de emplear las mismas fuentes de carbono: *Thiosphaera pantotropha* es incapaz de desnitrificar en presencia de metanol (Egert *et al*, 1993), tal y como lo hace *Hyphomicrobium* (Nyberg *et al*, 1992).

3) **Una baja tensión de oxígeno.** El oxígeno puede afectar a la desnitrificación de tres modos diferentes:

- 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 (Thauer *et al*, 1977).

- Efecto inhibitor a nivel enzimático, descendiendo la actividad de ciertas enzimas (Danies, 1989).
- Efecto inhibitor a nivel genético al no permitir la síntesis de ciertas enzimas en función de su concentración (Braun y Zumft, 1992).

Estos efectos no se detectan por igual en todos los microorganismos desnitrificantes, destacando unos más que otros dependiendo de la cepa bacteriana. Hay que indicar que existen microorganismos que son capaces de desnitrificar en presencia de oxígeno (Bonin and Gilewick, 1991; Patureau *et al*, 1994): tanto el NO_3^- como el oxígeno se emplean como aceptores de electrones, disponiendo la bacteria de los dos mecanismos enzimáticos. En estos casos, la capacidad de eliminación de NO_3^- desciende de modo proporcional a la concentración de oxígeno presente.

- 4) Presencia de **aceptores de electrones**, que serán óxidos de nitrógeno los cuales activan la síntesis de las enzimas desnitrificantes.

A parte de esta activación enzimática producida por la presencia de óxidos de nitrógeno, hay que destacar un efecto inhibitor que el nitrato tiene en el proceso. Este anión a grandes concentraciones inactiva la nitrito reductasa por lo que se produce una acumulación de NO_2^- que puede llegar a ser tóxico para la bacteria (Körner y Zumft, 1989). Por ello, hay que tener en cuenta que elevadas concentraciones de nitrato pueden inactivar el proceso y provocar acumulación de nitrito realizado por determinados microorganismos. Este fenómeno ha sido descrito en algunos desnitrificantes como *Pseudomonas aeruginosa* (Martienssen, and Schöps, 1999).

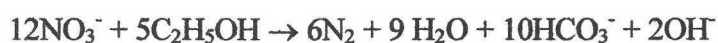
Hay otros factores que pueden afectar en mayor o menor grado al proceso, entre los que destacan:

- **pH:** el pH óptimo para la desnitrificación está próximo a la neutralidad, ligeramente alcalinos (7-8,5) aunque el valor 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 o superiores a 9.0 (Beaubien *et al*, 1995). De todos modos, este proceso se ha llegado a describir a pH entre 3.0 y 11.0, dependiendo en muchas ocasiones de la especie bacteriana, sin embargo, para valores que se salen de la neutralidad se detecta un importante descenso en la reducción de nitrato, así como un incremento en la producción de N₂O, un gas que afecta negativamente a la atmósfera. Estos efectos se deben básicamente a un efecto inhibitor a nivel enzimático, semejante al que se aprecia por efecto del O₂.

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 N₂O 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 N₂O, aumentaba la actividad desnitrificante y se registraba un espectacular incremento de la población desnitrificante, incrementándose por ello la actividad.

Se debe tener en consideración que el propio proceso de desnitrificación alcaliniza el medio donde tiene lugar, por lo que por sí mismo se puede ralentizar a no ser que se encuentre en elemento neutralizante en el medio, que mantenga el pH en neutralidad (Tarre and Green, 1994).



- **Temperatura:** la desnitrificación es un proceso biológico dependiente de la temperatura. Se puede considerar que la desnitrificación depende exponencialmente de este parámetro. Debido a esta influencia es de considerar una variación estacional del proceso, siendo más activo en verano y menos en invierno. El óptimo de temperatura para este proceso variará con la cepa bacteriana, encontrando un límite inferior sobre los 2°C (Payne, 1981) y un límite superior que vendrá marcado por la desnaturalización de las proteínas, aceptando como máximo 50 °C por Mc

Kenney (1979). Al igual que en el caso del pH se ha detectado también cierta influencia a nivel enzimático de la temperatura que pueden dar lugar a incrementos en la producción de N_2O , sobre todo con el descenso de ésta.

- **Presencia de tóxicos:** sustancias como metales pesados, pesticidas, sustancias fenólicas etc., que pueden aparecer en hábitats normales de desnitrificantes, pueden inhibir los procesos enzimáticos y afectar negativamente al desarrollo de los procesos metabólicos. Esta influencia afectará tanto al número de microorganismos como a su metabolismo.

El proceso de la desnitrificación se puede considerar como ubicuo, pues es realizado por un amplio grupo de bacterias que pueden ser desde autótrofas a heterótrofas, aerobias a anaerobias, psicrófilas a termófilas, etc., y ciertamente en cualquier medio donde coincidan los cuatro factores imprescindibles para el desarrollo de la desnitrificación, ésta tendrá lugar. Es así frecuente encontrar que este proceso se pone de manifiesto en suelos ricos en materia orgánica, en sedimentos, en aguas subterráneas etc. y como también se ha indicado este proceso es la única vía de salida de los compuestos asimilables de nitrógeno del medio natural.

Hoy día y debido al desarrollo socio económico, se incorporan al medio compuestos de nitrógeno en cantidad tan alta que se altera el ciclo, al no poder transformarse por completo a N_2 . Esto da lugar a problemas de acumulación que originan fenómenos de contaminación. Esto nos lleva a buscar una vía de salida de estas sustancias que se puede realizar imitando a la naturaleza. Este es el origen de la aplicación en tratamiento de aguas de los procesos biológicos de desnitrificación (Gómez, *et al*, 2000).

I.3.3.- Aplicación del proceso de desnitrificación

La desnitrificación biológica puede aplicarse de forma industrial para eliminar nitrógeno del medio, evitando así la acumulación de formas asimilables. En este sentido nos encontramos con aplicaciones variadas:

- Para reutilizar el agua procedente de acuicultura (Shanableh, *et al*, 1998; Skjolstrup, *et al*, 1998). Este agua contiene fósforo y amonio en alta concentración, por lo que debe ser tratada tanto para su reutilización como para su vertido; para ello se pueden emplear reactores de biopelícula en los que se alternan ciclos aireados y no aireados para favorecer los procesos de nitrificación y desnitrificación, respectivamente, eliminando así el amonio del agua.
- Desnitrificación como proceso coadyuvante para eliminar xenobióticos de naturaleza orgánica. Estos compuestos pueden utilizarse por los microorganismos desnitrificantes como donadores de electrones. Algunas aplicaciones son:
 - a) Eliminación de benceno, tolueno y xylenos (BTX), que aparecen en el agua subterránea contaminada por derivados del petróleo, problema de contaminación de acuíferos a escala mundial (Anderson, *et al*, 1998; Corseuil, *et al*, 1998; Hutchins, *et al*, 1998).
 - b) Eliminación de compuestos orgánicos volátiles (COV) existentes en las emisiones gaseosas de plantas de tratamiento de aguas residuales. Estos compuestos constituyen un problema medioambiental importante; las tecnologías convencionales para su eliminación son satisfactorias pero de un coste excesivo para poder ser aplicadas en las estaciones de depuración. Por ello, se está investigando sobre el proceso de

desnitrificación empleando los COV como fuente de carbono de forma que sean eliminados del medio. (Rihn, *et al*, 1997).

- c) Eliminación de el tricloroetileno, contaminante procedente de vertederos de residuos peligrosos, que puede ser biodegradado por *Pseudomonas picketti* bajo condiciones desnitrificantes (Degraffenreid, *et al*, 1998).
- Eliminación de bromato (BrO_3^-), simultánea a la eliminación de nitrato en un reactor biológico de desnitrificación empleado para tratamiento de agua potable. El bromato es un compuesto tóxico que puede estar presente en aguas desinfectadas con ozono, aunque también se ha observado en aguas procedentes de río, como sucede en el río Rhin donde se ha observado bromato en el agua en concentraciones de 8 $\mu\text{g/l}$. Un estudio reciente sobre eliminación biológica del bromato reveló que podía ser reducido a bromide por bacterias desnitrificantes como *Pseudomonas*, por lo que actualmente se investiga sobre la capacidad de eliminar bromato en un reactor de biopelícula para desnitrificación. (Hijnen, *et al*, 1999).
 - La eliminación de nitrógeno de agua residual urbana cuyo vertido se realiza en zona sensible (R.D. 1996) se puede realizar en un reactor biológico dividido en dos zonas (aeróbica y anaeróbica) para que tengan lugar los procesos de nitrificación y desnitrificación. Este proceso es una solución viable tanto técnica como económicamente para grandes y pequeños municipios (Rolf, *et al*, 1998; Canziani, *et al*, 1999).
 - Desnitrificación de agua residual industrial con alta concentración en nitrato y elevada salinidad (Glass, *et al*, 1999). Este residuo con alta concentración en nitrato es producido por muchas industrias, como productoras de celulosa, explosivos, fertilizantes, pesticidas, etc., donde la concentración de nitrato puede ser superior a los 4.500 mg/l, o bien en plantas productoras de armas nucleares donde el agua residual puede contener incluso concentraciones de 50.000 mg/l

de nitrato. Por este motivo dichas industrias favorecen el estudio de un proceso de eliminación de nitrato de bajo coste, de forma que puedan realizar sus vertidos sin tener que pagar cánones.

- Eliminación de nitrato de aguas subterráneas mediante sistemas de biopelícula (Bourrel, *et al*, 2000), aplicación en la que se centra esta investigación. La desnitrificación del agua subterránea se puede realizar mediante bacterias autótrofas (Feleke, *et al*, 1998) o mediante bacterias heterótrofas (Gómez, 1998; Hayes, *et al*, 1998).

1.3.3.1.- Biopelículas: concepto y funcionamiento.

Las biopelículas se pueden considerar como adaptaciones de los microorganismos al medio, las cuales les permiten realizar sus funciones vitales de forma más adecuada, permitiéndoles a su vez captar una mayor concentración de nutrientes. Básicamente esta biopelícula estará formada por una agrupación de células simples o microcolonias embebidas en una matriz polimérica de origen microbiano, que lógicamente debe formarse sobre un soporte.

Estas biopelículas que pueden causar problemas como la corrosión o fenómenos de contaminación en redes de abastecimiento de aguas se emplean hoy día de forma beneficiosa para el tratamiento de aguas residuales (Lazarova *et al* 1999) o la biorremediación de aguas subterráneas contaminadas (González-López *et al*, 1998).

El origen de la biopelícula reside en la producción de un exopolisacárido por parte de una bacteria que le permite adherirse a una superficie. A partir de esta unión inicial, los microorganismos pueden multiplicarse, dando lugar a este tipo de asociaciones biológicas. Sobre esta asociación inicial pueden adherirse otra serie de microorganismos tales como algas, protozoos, otras bacterias etc., que encuentran en ellas las necesidades fundamentales para su desarrollo. Estas biopelículas que aparecen de forma espontánea en la naturaleza, básicamente facilitan el desarrollo de aquellos microorganismos que la componen,

permitiéndoles captar con más efectividad que en vida libre los nutrientes precisos. Son por ello estructuras capaces de retirar sustancias presentes en el agua, especialmente adaptadas al agua en movimiento. Esta característica de las biopelículas las convierte en un elemento depurador o descontaminador de un flujo de agua, por lo que despierta un gran interés su aplicación en tratamientos del agua.

No existe un modelo que explique de forma correcta la estructura de una biopelícula. Esta es muy variable y dependerá de gran cantidad de factores, entre los cuales se debe considerar la presencia de nutrientes en el medio (Lazarova and Manen, 1995). En función de esto se pueden encontrar biopelículas más o menos densas, con más o menos porosidad y con diferente espesor. En estos aspectos también influirán otros factores como los microorganismos que la forman (Sich and Van Rijn, 1997) y el soporte sobre el cual se desarrolla.

Atendiendo a esta concentración de nutrientes, se pueden encontrar biopelículas diferentes. Así si en el medio hay altas concentraciones de nutrientes, se podrán formar biopelículas densas con un gran grosor y poca porosidad, como la que se puede apreciar en la figura I.4. Son estructuras de crecimiento muy rápido y con una fuerte estratificación, debido a la diferente disponibilidad de nutrientes en función de las capas. Este tipo de biopelículas son más frecuentes si el medio acuoso de contacto es agua residual. Todo lo contrario se apreciará si ese medio acuoso es pobre en nutrientes, donde la biopelícula será una estructura menos densa con poco espesor y muy canalizada (porosa). Esto es apreciable en superficies en contacto con aguas limpias como ríos, arroyos o incluso en las canalizaciones de agua de abastecimiento. Estas biopelículas son de crecimiento lento.

Es también a considerar que la composición de la biopelícula influirá en el proceso depurador que se pretende, no sólo a nivel de la eliminación de sustancias indeseables, cuya presencia y concentración en el medio que contacta con la biopelícula puede hacer variar las características y composición de ésta (Ohashi et al 1999), sino también en cuanto a su crecimiento, factor relacionado con los fenómenos de atasco, principal problema de funcionamiento de los biofiltros.

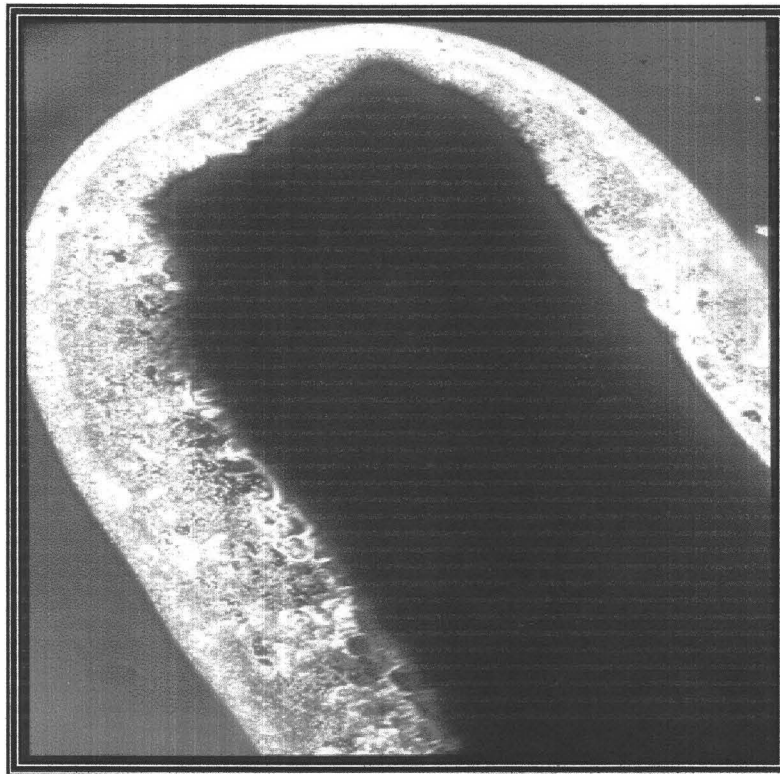


Figura I.4.- Aspecto de biopelícula formada sobre un soporte cerámico procedente de residuos de la construcción.

Una de las aplicaciones de los sistemas de biopelícula es la eliminación de nitrato de aguas subterráneas contaminadas, mediante la aplicación del proceso biológico de la desnitrificación (Gómez, 1998).

I.3.3.2.- Sistemas para aplicar el proceso de desnitrificación

La aplicación de este proceso biológico se puede llevar a cabo bien mediante cultivos en suspensión o bien por cultivos inmovilizados:

- En los **sistemas de cultivos en suspensión** ponemos en contacto los compuestos de nitrógeno con los microorganismos responsables de su transformación en un medio acuoso, manteniendo a éstos en suspensión. Son los denominados fangos

activos en los cuales es necesario de modo continuo aportar microorganismos para mantener un equilibrio entre éstos y los compuestos contaminantes.

- Por el contrario, los **sistemas de cultivo inmovilizado** se basan en una formación biológica de origen bacteriano denominada biopelícula, la cual se formará sobre una superficie o material soporte. El agua que se quiere tratar se pasa a través de este material soporte que contendrá la biopelícula. Este sistema no precisa de un continuo aporte de microorganismos, pero sí precisa de un lavado frecuente del sistema por los problemas de pérdida de carga que se pueden poner de manifiesto.

Tanto los sistemas en suspensión como los inmovilizados presentan una gran cantidad de variantes y como es lógico pensar, cada uno de ellos presentará una serie de ventajas e inconvenientes.

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

- Reducción de la producción de ruido.
- Reducción de 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.
- Se pueden emplear residuos procedentes de la construcción, los cuales pueden actuar como soporte para el cultivo inmovilizado o Biopelícula, contribuyendo de esta forma al reciclado de residuos.

Todas estas ventajas de los sistemas de cultivo inmovilizado unidas a que los sistemas en suspensión producen un efluente con una concentración muy elevada de microorganismos, hacen que para la aplicación del proceso biológico de desnitrificación de agua subterránea únicamente se empleen los sistemas de biopelícula.

Dentro de los diferentes **sistemas de biopelícula** se pueden resaltar los procesos de biodiscos, lechos fluidificados, lechos bacterianos o filtros sumergidos (Figura I.5), sistemas sobre los que se está investigando actualmente su modelización (Bourrel, *et al*, 2000).

Los sistemas de biopelícula son una alternativa a los procesos físico/químicos convencionales dado su bajo coste, siendo el principal problema de estos sistemas el tratamiento posterior necesario para considerar el agua potable. Dicho tratamiento se requiere para eliminar los microorganismos presentes en el agua de salida del proceso y el residuo de fuente de carbono que pueda existir.

Fuchs, *et al* (1997) estudiaron la posibilidad de formar la biopelícula sobre una membrana para eliminar dicho problema, apreciándose que el residuo de fuente de carbono en el agua de salida no se presenta debido a que la membrana y la biopelícula formada actúan como barrera frente al paso de fuente de carbono y de nutrientes, mientras que el número de microorganismos no descendía. Si dicha membrana es de intercambio iónico, se consigue un efluente que no requiere de un tratamiento posterior para considerarlo como agua potable (Fonseca, *et al*, 2000).

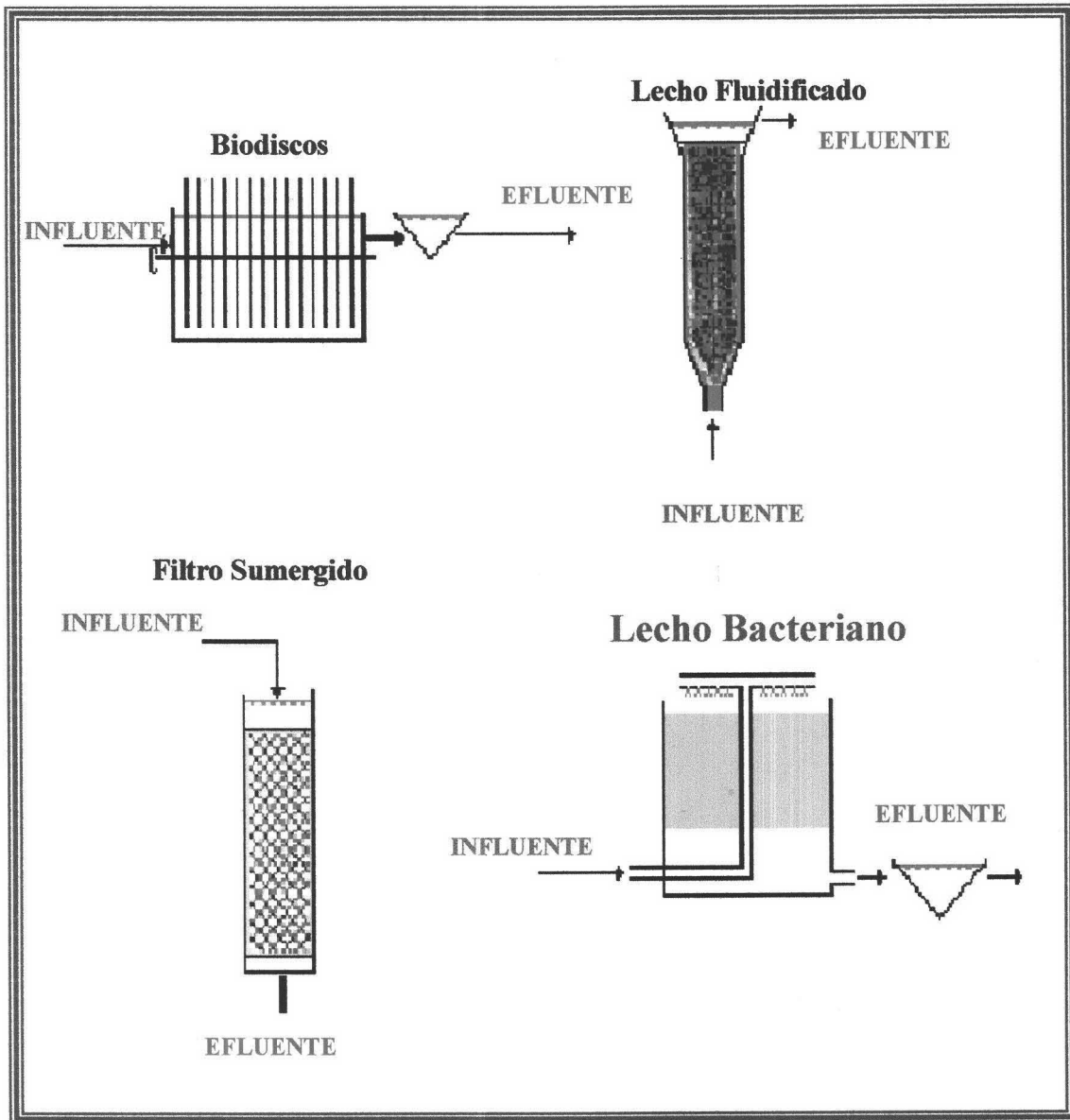


Figura I.5.- Aspecto de algunos sistemas de biopelícula.

En el medio existen bacterias desnitrificantes autótrofas y heterótrofas, por lo que en los sistemas de biopelícula se puede trabajar con dos tipos diferentes de procesos de desnitrificación en función de los microorganismos responsables del tratamiento: desnitrificación autótrofa (las bacterias emplean donadores de electrones inorgánicos) o desnitrificación heterótrofa (las bacterias emplean donadores de electrones orgánicos).

Entre los *sistemas de biopelícula empleados para la desnitrificación autótrofa* se encuentran los siguientes:

- a) *Desnitrificación bioelectroquímica*: consiste en un reactor biológico en el cual los microorganismos autótrofos desnitrificantes se adhieren a la superficie del cátodo de un electrodo, siendo el donador de electrones gas hidrógeno producido mediante electrólisis del agua. En este reactor la desnitrificación por H_2 y neutralización por CO_2 producido por el cátodo y ánodo, respectivamente, sucede cuando se aplica una corriente eléctrica (Sakakibara, *et al*, 1997; Islam, *et al*, 1998).

Feleke, *et al* (1998), estudiaron el proceso bajo diferentes corrientes eléctricas analizando las diferentes reacciones producidas y la selectividad en la eliminación de nitrato en presencia de otros compuestos iónicos. Se observó que aplicando diferentes corrientes eléctricas las concentraciones de SO_4^{2-} , Na^+ , K^+ , Cl^- y PO_4^{3-} eran prácticamente las mismas en el influente y efluente, consiguiéndose la eliminación total de NO_3^- sin detectar NO_2^- , N_2O ni NH_4^+ en el agua de salida. Sin embargo, si se observaron depósitos de Ca^{2+} y de Mg^{2+} debido al proceso de neutralización por CO_2 , iones que era posible eliminar si se cambiaba la polaridad de los electrodos. Así pues, el reactor de biopelícula sobre electrodo se presenta como un método selectivo para la reducción de nitrato.

Cast, *et al* (1998) estudiaron la influencia en el proceso de desnitrificación bioelectroquímica del material del cátodo, así como el impacto que produce el cobre en dicho proceso. La mayoría de los estudios realizados emplean grafito como material, pero dicho material presenta problemas para ser aplicado a escala industrial por su fragilidad y el volumen necesario, por lo que se comparó el rendimiento del proceso colocando como material del cátodo grafito o acero inoxidable (seleccionado por su resistencia y su manejabilidad), apreciándose que no existían diferencias estadísticamente significativas en el empleo de diferente material. El cobre (añadido para simular la presencia de un metal pesado en el agua)

se observó que inhibía a los microorganismos que formaban la biopelícula, reduciendo la eficacia del proceso de desnitrificación de los electrodos.

- b) *Estimulación electrolítica de la desnitrificación en columnas de tierra*: este proceso se estudia para ver la posibilidad de emplear procesos bioelectroquímicos para estimular la biorremediación *in situ* del agua subterránea contaminada con nitrato. Igual que sucedía en el método anterior, en lugar de añadir fuentes de carbono orgánicas, se emplea un electrodo de forma que al pasar una corriente eléctrica se produce la reacción de electrólisis en el cátodo generando el donador de electrones (por ejemplo, H₂) necesario para la desnitrificación.

En el método anterior, el electrodo se introducía en un reactor, mientras que en este método se estudia la posibilidad de introducirlo en el área contaminada por nitrato, para lo cual se ensayó en primer lugar en laboratorio con unas columnas de tierra (Hayes, *et al*, 1998), demostrando que dicho proceso puede ser empleado para la biorremediación de compuestos como el nitrato cuya biodegradación es posible empleando hidrógeno como donador de electrones. Para mejorar el rendimiento del sistema, es necesario considerar las variaciones de pH que se producen debido a las reacciones que tienen lugar en el ánodo y cátodo; así pues, dependiendo de las condiciones del subsuelo, será necesario emplear métodos para controlar el pH como parte del sistema de remediación.

- c) *Desnitrificación autótrofa en lecho fluidificado inoculado con Alcaligenes Eutrophus* (Chang, *et al*, 1999), similar a los dos métodos anteriores con la variación de que el donador de electrones empleado (H₂) se introduce en el proceso directamente y no mediante electrólisis del agua.

Dado que la mayoría de las bacterias desnitrificantes en el medio son heterótrofas (requieren una fuente de carbono orgánica para desarrollar energía y para el crecimiento celular) los sistemas más desarrollados hoy día para la desnitrificación son los que emplean

una fuente de carbono orgánica. Entre los *sistemas de biopelícula empleados para la desnitrificación heterótrofa* se encuentran los siguientes:

- a) *Lagunaje de poca profundidad*: la eliminación de nitrato sucede a través de dos mecanismos, la admisión de nitrógeno de las plantas y la desnitrificación, mecanismo dominante en la eliminación de nitrógeno. Las lagunas tienen dos características que favorecen la desnitrificación: por una lado los sedimentos, con los que se tiene un ambiente anóxico, y por otro el crecimiento de las plantas, el cual proporciona la fuente de carbono necesaria que llegará a la zona de sedimentación. Estudiando la relación entre ambos mecanismos (Reilly, *et al*, 2000; Lund, *et al*, 2000) se ha observado que prácticamente entre un 89-95% de la eliminación de nitrato es realizada por la desnitrificación, aprovechándose la eliminación realizada por las plantas como suministro posterior de fuente de carbono para las bacterias.

La mayoría de las lagunas que existen se emplean para tratar agua residual que proviene de sistemas de lagunaje o de otros sistemas de tratamiento secundario con concentraciones de nitrato bajas (<5mg/l), excepto aquellos que están específicamente diseñados para desnitrificación. Por tanto, en el diseño de este sistema para la eliminación de nitrato hay que tener en cuenta dos aspectos diferentes al resto de los casos (Baker, 1998):

- El influente tiene nitrógeno prácticamente sólo en forma de nitrato.
- El suministro de fuente de carbono tiene que ser el 100% proveniente de la propia laguna, alcanzándose rendimientos superiores al 90% en eliminación de nitrato para una relación C/N > 5.

- b) *Biodiscos, lechos fluidificados, lechos bacterianos o filtros sumergidos* son sistemas muy utilizados para la desnitrificación empleando como fuente de carbono metanol, etanol, ácido acético o glucosa. La elección entre una fuente y otra se basa normalmente en criterios económicos, aunque influya en otros aspectos como rendimiento del proceso, características del agua tratada, etc. (Gómez, 1998).

Estos sistemas también se pueden utilizar para la desnitrificación empleando como sustrato para el desarrollo de la biopelícula trigo (Soares, *et al*, 1998), papel de periódico (Volokita, *et al*, 1996b) o algodón (Volokita, *et al*, 1996a), sustrato que a la vez se emplea como fuente de carbono. En estos casos el principal problema es que admiten cargas hidráulicas excesivamente bajas como para poder ser desarrollados a escala industrial.

Mohseni-Bandpi, *et al* (1998) estudió la desnitrificación del agua subterránea, a escala de planta piloto, en un contactor biológico rotativo (CBR) empleando tres fuentes diferentes de carbono orgánicas: metanol, etanol y ácido acético, encontrándose la relación óptima de C/N en 1.1, 1.3 y 1.7, respectivamente. El rendimiento en eliminación de nitrato más elevado fue para el empleo de ácido acético (98%), siendo además la concentración de nitrito en el efluente mínima. El contenido de sólidos en suspensión y turbidez del agua era menor en el caso de emplear metanol como fuente de carbono. En cualquier caso, se concluye que la desnitrificación es posible empleando un CBR con cualquiera de las tres fuentes de carbono utilizadas, siendo necesario en cualquier caso un tratamiento posterior para oxidar la fuente de carbono residual y eliminar los microorganismos antes de emplearse como agua potable. Posteriormente, Mohseni-Bandpi, *et al* (1999) estudió la desnitrificación en un CBR usando únicamente la fuente de carbono que se había considerado más eficiente (ácido acético), encontrando que la especie bacteriana dominante era *Pseudomonas*, principalmente *Ps. strutzeri* y *Ps. fluorescens* y que el rendimiento en eliminación de nitrato variaba entre un 99 y un 83% para cargas de 76 y 490 mg/m²·hora respectivamente, con un caudal de 2.5 l/min y a temperaturas de 20 ± 2 °C.

De todos estos sistemas los que mejores resultados han ofrecido en la eliminación de nutrientes para obtener aguas potables son los denominados filtros sumergidos. Estos sistemas consisten en un material de relleno sobre el cual se desarrolla la biopelícula responsable de la depuración, (Rogalla *et al*, 1992) manteniéndose ésta 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 NO_3^- disuelto en el agua contaminada, ofrece una alternativa de tratamiento a las aguas subterráneas contaminadas con este anión.

En estos sistemas la biopelícula se encarga, mediante desnitrificación, de eliminar selectivamente el 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.

I.3.4.- Filtros sumergidos. Estado actual del proceso

Las principales instalaciones de depuración de aguas residuales urbanas se construyeron en Alemania a principios del siglo XX, consistiendo en procesos de biopelícula fija, sistemas que quedaron rápidamente relegados a un segundo plano con la aparición de un estudio realizado por Arden y Locket (1914). En este estudio se proponía el sistema de fangos activos, sistema que hoy día se emplea en la mayoría de las grandes instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas tanto para la eliminación de materia orgánica como de nutrientes.

Al margen de la versatilidad del proceso de fangos activos, actualmente se reconocen una serie de problemas que han impulsado las investigaciones en otros sistemas y, entre ellos, principalmente los filtros biológicos inundados; entre estos problemas destacan:

- Elevados requerimientos de espacio para el reactor biológico, que se incrementan considerablemente si se pretende nitrificar.

- Alto coste de primera instalación y de explotación.
- Generación de ruidos y olores.
- Impacto visual.

En los setenta, aparecen las primeras referencias bibliográficas en las que algunos autores hacen públicas sus investigaciones orientadas a desarrollar procesos de tratamiento más compactos tan eficientes como los fangos activados (Grasmick *et al.*, 1979; Leglise, 1980) y que fueron desarrollados por grandes empresas francesas.

El resultado de este trabajo, aún incipiente, fue la proposición de un nuevo proceso, nacido desde la tecnología de filtros de agua potable, y que se dio en llamar Filtros Biológicos Inundados.

Hamoda y Abd-El-Bary (1987) llevaron a cabo un detallado análisis de la cinética del sistema, usando un modelo matemático. En el año 1982 se estudiaron las características hidráulicas para patentes de reactores biopelícula aireados, cuyo soporte era un material prefabricado, para mejorar los sistemas de fangos activados existentes, y predijeron los problemas que podían esperarse durante la operación.

Así pues, los primeros pasos en filtros de película fija a un soporte tuvieron lugar al intentar mejorar el funcionamiento de fangos activados mediante la introducción de un medio plástico en las balsas de aireación usadas en este sistema, combinándose procesos de crecimiento de película fija y suspendida.

Sin embargo, la escasa área activa disponible del material soporte, se tradujo en bajos niveles de depuración e indujo a desarrollar los filtros biológicos inundados con soportes granulares con un diámetro de partícula comprendido entre 1 y 6 mm.

La década de los noventa asiste a un gran auge en el estudio más profundo y generalizado de los distintos sistemas biopelícula, sin que ello haya sido óbice para que también continuase la investigación sobre la combinación de biomasa suspendida y fija (Lessel, 1991), o un conjunto de lechos bacterianos colocados en serie (Parker *et al.*, 1990).

A pesar de que este tipo de procesos de biopelícula ya se aplican en bastantes lugares del mundo, la investigación en el tema es aún muy necesaria, pues el dimensionamiento de filtros biológicos inundados está basado prácticamente en conceptos empíricos y pruebas a escala de planta piloto.

El interés suscitado por este tipo de filtros permanece en la actualidad y encontramos referencias recientes que así lo atestiguan, como las experiencias registradas en Francia por la Compañía General de Aguas y Liones de Aguas (cabe destacar la Estación Depuradora de Mónaco; 1990) o las de Canadá a raíz de las nuevas exigencias establecidas en su normativa en 1993 (Kantardjieff, 1997); También pueden mencionarse los estudios de E.H. Marsman *et al* (1997), en los que se busca una eliminación de nitrógeno con procesos de película fija, posterior a una eliminación de materia carbonada y fósforo en una etapa previa, constituyendo ésta un proceso de fango activado de alta carga.

La mayoría de plantas con biofiltros inundados se localizan en áreas urbanas densamente pobladas o enclaves turísticos (montañosos o costeros). Las primeras implantaciones industriales tuvieron lugar en los comienzos de los ochenta (Partos *et al.*, 1985; Sibony, 1983). Hacia 1992 operaban en el mundo alrededor de cincuenta plantas en países como Canadá, Estados Unidos, Japón y varios de Europa (fundamentalmente Francia).

En España las realizaciones de este tipo son mínimas; actualmente hay tres estaciones depuradoras con este sistema: Puerto de Santa María, Ibiza y Santa Cruz de Tenerife. La investigación en este campo, en nuestro país, se inició en la *Cátedra de Ingeniería Sanitaria y Ambiental de la E.T.S. de Caminos, Canales y Puertos de la Universidad de Granada* en el año 1989. Actualmente, son varias las Tesis Doctorales

sobre Filtros Biológicos Inundados llevadas a cabo por el grupo de investigación Microbiología y Técnicas Ambientales, con la finalidad de **optimizar el sistema de lechos inundados con soporte de residuos reciclados para su aplicación al tratamiento tanto de aguas residuales como subterráneas contaminadas con nitrato.**

Centrándonos en los estudios realizados sobre la aplicación de los Filtros Biológicos Inundados para la eliminación de nitrato de aguas subterráneas, veamos cual es el **estado actual y que parámetros influyen en el proceso de desnitrificación.**

En la investigación realizada del proceso de eliminación biológica de nitrato de agua subterránea mediante filtros sumergidos se estudió:

- La posible influencia de la fuente de carbono (tipo y concentración aplicada) en el rendimiento del sistema comparando tres fuentes de carbono (etanol, metanol y sacarosa), buscando la causa de esto en la composición de la biopelícula, tipo de bacterias desnitrificantes implicadas y su actividad.
- Debido al efecto negativo que el oxígeno ejerce sobre el proceso, se estudió de que modo podría afectar al proceso depurador y los posibles cambios que la presencia de oxígeno producirían en la composición de la biopelícula.
- Por último, se estudió la influencia que sobre el rendimiento y la composición de la biopelícula podrían tener las variaciones de carga hidráulica y de nitrato.

Dado que el estudio se realizó sobre agua subterránea contaminada por NO_3^- , se llevó a cabo, previo a la realización de los ensayos, la formación de la biopelícula responsable del proceso de desnitrificación. Para ello, se empleó licor mezcla procedente del reactor de fangos activos de la Estación Depuradora Puente de los Vados (Granada), que contenía gran cantidad de MLSS (3000), permitiendo una rápida colonización del relleno. Este licor mezcla, enriquecido con nitrato y con la fuente de carbono a ensayar se mantuvo en recirculación durante 7 días. Tras la recirculación se limpió el sistema mediante

un ciclo manual de aire y agua, comenzando posteriormente a aportar el agua a tratar y la fuente de carbono.

Las principales conclusiones obtenidas en esta investigación realizada por Gómez, (1998) fueron las siguientes:

- 1^a) El etanol es el mejor aditivo de las tres fuentes de carbono ensayadas, ya que 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 ésta problemas de toxicidad.
- 2^a) 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 rendimiento es menos acusado para el etanol, cuya dosificación debe incrementarse un 11% en presencia de 4,5 mg/l.
- 3^a) La actividad desnitrificante de las cepas que componen la biopelícula varía en función de la especie bacteriana, mientras que el número de desnitrificantes varía en función de las condiciones de trabajo. La combinación de estos dos factores (actividad desnitrificante potencial) es la responsable de la mayor o menor eliminación de nitrato del sistema.
- 4^a) La actividad desnitrificante potencial de las cepas aisladas de la biopelícula empleando etanol como fuente de carbono, fue mayor para cepas de las especies *Agrobacterium radiobacter*, *Pseudomonas mendocina* y *Pseudomonas picketti*.
- 5^a) Los consumos de etanol aumentan conforme aumenta la carga superficial, manteniéndose una relación entre 0.37 y 0.51 unidades de etanol por cada unidad de nitrato eliminado.

- 6ª) La presencia de nitrito en el agua de salida se incrementa con la carga superficial, siendo más acusado cuando el incremento de la carga se debe a un aumento de caudal. Así, los valores óptimos de carga hidráulica y de carga superficial para cumplir con las exigencias legislativas en cuanto al nitrato se encuentran en torno a $18 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{día}$ y a $2,23 \text{ kg NO}_3^-/\text{m}^3\cdot\text{día}$, respectivamente, siendo necesario un tratamiento más exhaustivo del efluente tratado para eliminar el nitrito.
- 7ª) La altura de lecho necesaria se incrementa con la carga superficial, siendo ésta mayor cuando la variación de la carga se debe a un aumento en la concentración de nitrato más que a un incremento de caudal. Para caudales altos, no se logra eliminar la producción de nitrito con mayores alturas, encontrándose el óptimo en 1.5 m de altura.

Es importante tener en cuenta que los núcleos urbanos más afectados por el problema de la contaminación de acuíferos suelen ser pequeñas poblaciones con recursos económicos limitados, por lo que procesos físicos, químicos o físico – químicos (como la ósmosis inversa, el intercambio iónico, la electrodiálisis,...) no son los más factibles para la eliminación de nitrato del agua subterránea. Se precisa de nuevos procesos con menor coste de explotación y mantenimiento.

Por todo esto, se pretende obtener un sistema técnica y económicamente viable que nos permita solucionar los problemas de contaminación por nitrato de los acuíferos para pequeñas poblaciones. Todas las conclusiones anteriores llevan a pensar en la posibilidad de trabajar en la eliminación de nitrato del agua subterránea mediante filtros sumergidos empleando la inoculación selectiva. La selección de cepas bacterianas con alto poder desnitrificante y su empleo en la inoculación del filtro biológico optimizarán los parámetros de diseño así como la explotación del proceso.

Así pues, se plantea la **MEJORA DE LOS PARÁMETROS DE DISEÑO DE FILTROS SUMERGIDOS APLICADOS A LA DESNITRIFICACIÓN DE AGUAS SUBTERRÁNEAS MEDIANTE LA INOCULACIÓN SELECTIVA.**

**II.- INVESTIGACIÓN
BIBLIOGRÁFICA**

II.- INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA

Para la realización del presente trabajo se llevó a cabo una revisión bibliográfica actualizada continuamente, conociendo así las investigaciones publicadas en esta materia.

Los principales servicios de documentación a los que se acudió fueron los siguientes:

- Colegio de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos.
- Área de Tecnologías del Medio Ambiente del Departamento de Ingeniería Civil de la Universidad de Granada.
- Biblioteca de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos de la Universidad de Granada.
- Biblioteca del Instituto del Agua de la Universidad de Granada.
- Biblioteca General de la Universidad de Granada.
- Biblioteca del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada.
- Biblioteca de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada.
- Biblioteca de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada.
- Biblioteca de la Estación Experimental Zaidín del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Granada.

Las Bases de Datos a las que se tuvo acceso a través de los servicios indicados anteriormente se enumeran a continuación:

- AQUALINE-25 (Water Research Centre)
- COMPENDEX-4 (Engineering Information Inc.)
- ENVIROLINE-11 (Environment Information Center Inc.)
- AFEE-73 (Association Francaise pour L'Etude des Eaux)
- POLLUTION-18 (Cambridge Scientific Abstracts)
- SCI (Science Citation Index)
- CC (Current Contents)
- CSIC (Centro Superior de Investigaciones Cientificas)

Los grupos de palabras clave con los que se accedió a las Bases de Datos y demás búsquedas realizadas fueron:

- groundwater and contamination and nitrate;
- nitrate and groundwater and removal;
- nitrate and drinking water and removal;
- drinking water and denitrification;
- biofilter and denitrification;
- biofilter and nitrate and removal;
- biofilter and denitrifying;

- groundwater and denitrification;
- biofilter and inoculation;
- *Pseudomonas fluorescens*;
- *Agrobacterium radiobacter*;
- *Hydrogenophaga pseudoflava*;
- biofilm and composition;
- denitrifying bacteria;
- denitrifying *Pseudomonas*.

En el apartado anterior (I.- Introducción) se realizó un resumen de los aspectos más relevantes encontrados en el proceso de investigación bibliográfica relacionados con este trabajo.

En el apartado XI. se indican todas las referencias bibliográficas encontradas y empleadas en esta investigación.

III.- OBJETIVOS

III.- OBJETIVOS

Un alto consumo de nitrato por mamíferos y la reducción que sobre éste produce la flora bacteriana intestinal, dan lugar a la formación de altas concentraciones de nitrito, el cual puede producir efectos nocivos sobre la salud. Por ello se debe evitar el consumo de aguas contaminadas con este anión, quedando inutilizados para su empleo muchos acuíferos. Estos problemas son más graves en épocas de sequía, en las que el agua subterránea se convierte en el único recurso disponible para muchas zonas. Por otro lado, se debe considerar que hay poblaciones que sólo cuentan con este recurso, por lo que la contaminación de acuíferos demanda una inmediata solución.

Es importante tener en cuenta que los núcleos urbanos más afectados por este problema suelen ser pequeñas poblaciones con recursos económicos limitados, por lo que procesos como la ósmosis inversa o el intercambio iónico no son los más factibles para la eliminación de nitrato del agua subterránea. Se precisa de nuevos procesos con menor coste de explotación y mantenimiento.

La biodesnitrificación aplicada mediante filtros sumergidas es una tecnología adecuada para eliminar nitrato de agua subterránea contaminada. Para este proceso es necesario realizar un control del tipo y concentración de fuente de carbono más adecuado a emplear, niveles de oxígeno disuelto, pH y temperatura en el influente, así como de la pérdida de carga en la columna. (Gómez, 1998). Sin embargo, la composición microbiológica de la biopelícula es el principal factor que determina el rendimiento del proceso. Con esta idea se trata de estudiar la influencia del tipo de microorganismos que componen la biopelícula en el rendimiento del sistema, así como las ventajas que ofrece a nivel de diseño de la tecnología.

Así pues, se pretende obtener un sistema técnica y económicamente viable que nos permita solucionar los problemas de contaminación por nitrato de los acuíferos para pequeñas poblaciones, buscando LA MEJORA DE LOS PARÁMETROS DE DISEÑO DE FILTROS SUMERGIDOS APLICADOS A LA DESNITRIFICACIÓN DE AGUAS SUBTERRÁNEAS MEDIANTE LA INOCULACIÓN SELECTIVA.

Se plantea como **OBJETIVO PRINCIPAL** el siguiente:

Reducción del volumen de instalación y mejora de los costes tanto de inversión como de explotación.

Los procesos actualmente viables a nivel de instalación industrial son la ósmosis inversa, el intercambio iónico y la biodesnitrificación, siendo difícil establecer una comparativa detallada en costes de inversión y costes de explotación debido a la escasa aplicación de estos sistemas para la eliminación de nitrato de aguas subterráneas contaminadas. En Europa existen algunas instalaciones de biodesnitrificación a escala industrial (Dahab *et al*, 1991; Rogalla, *et al*, 1990), en América es el intercambio iónico el más aceptado (Dahab *et al*, 1991; Guter, 1987), mientras que la ósmosis inversa es la tecnología que más se aplica en la actualidad para este fin.

El tratamiento biológico a nivel de inversión exclusivamente del proceso de eliminación de nitratos requiere menor capital que los dos anteriores, sin embargo, teniendo en cuenta el proceso completo de potabilización, la inversión total dependerá del tratamiento posterior necesario según la calidad global del agua tras la biodesnitrificación.

Desde el punto de vista de la explotación, el tratamiento biológico requiere en principio menos recursos tanto energéticos como de reactivos, representando el consumo de fuente de carbono el principal gasto de explotación del sistema.

Se pretende emplear la inoculación selectiva para reducir costes de inversión y de explotación.

Dado que frecuentemente el problema de la contaminación de acuíferos, que sobrepasan el nivel de nitrato máximo permitido por la legislación, es de tipo puntual, es importante reducir el volumen de la instalación de forma que se pueda montar sobre un soporte móvil. De esta manera se podrían solucionar los problemas puntuales de contaminación que dejan sin agua potable a pequeños municipios.

Como **OBJETIVOS SECUNDARIOS** se marcan los siguientes:

1º) Minimización de la puesta en marcha del filtro biológico para desnitrificación: se pretende reducir el tiempo necesario para la formación de la biopelícula permitiendo la puesta en marcha en pocas horas. Para ello será necesario realizar:

- Estudio de la formación de biopelícula desnitrificante mediante inoculantes con alta carga bacteriana.
- Estudio de la formación de biopelícula desnitrificante mediante cultivos puros de cepas desnitrificantes.
- Influencia del tiempo de recirculación en la actividad desnitrificante y rendimiento del biofiltro.
- Influencia del inoculante empleado en la actividad desnitrificante y rendimiento del biofiltro.

Este objetivo se llevó a cabo en una planta a escala de laboratorio.

2º) Estudio de los parámetros de diseño de los filtros biológicos aplicados a la desnitrificación empleando inoculación selectiva. Se pretende, una vez seleccionado el microorganismo para la inoculación del filtro, obtener los parámetros de carga hidráulica, carga de nitrato y altura de relleno buscando minimizar el coste de 1ª instalación del sistema, para lo cual se empleó una planta a escala semi-técnica.

**IV.- METODOLOGÍA ANALÍTICA Y
MÉTODOS DE ESTUDIO**

IV.- METODOLOGÍA ANALÍTICA Y MÉTODOS DE ESTUDIO

En los apartados V y VI se describen los parámetros y variables empleados, exponiendo primero esta metodología analítica dada su importancia, ya que estas variables y parámetros se fueron modificando según las necesidades del trabajo.

IV.1.- BACTERIAS DESNITRIFICANTES EMPLEADAS.

Para llevar a cabo un proceso de biodesnitrificación mediante la tecnología de filtros sumergidos (proceso de biopelícula) de aguas subterráneas, donde la carga bacteriana presente es muy baja, se precisa inicialmente el desarrollo de una biopelícula activa sobre el material soporte que rellena el filtro biológico. Este paso ha sido realizado tradicionalmente empleando licor mezcla procedente del reactor biológico de una planta de tratamiento de aguas residuales (Gómez *et al*, 2000), debido a la alta carga bacteriana que este medio contiene y al alto porcentaje de bacterias desnitrificantes que en este sistema podemos encontrar.

El sistema así inoculado es capaz de eliminar nitrato del agua contaminada de forma adecuada, sin embargo la gran variedad de microorganismos que presenta puede dar lugar a consumos elevados de materia orgánica así como aportar al agua elementos que alteran la calidad del efluente obtenido. Esto nos lleva a pensar en la inoculación selectiva como mejora del proceso, para lo cual debemos contar con bacterias desnitrificantes para formar selectivamente la biopelícula.

Estos microorganismos se obtuvieron desde la biopelícula formada a partir del licor mezcla en el interior de un filtro sumergido a escala semi-técnica, una vez puesto el sistema en marcha alcanzando rendimientos óptimos (99.99% de eliminación de nitrógeno) con una concentración de oxígeno disuelto en el influente de 4.5 mg/l y empleando etanol como fuente de carbono (C/N=1.08). El procedimiento empleado consistió en las siguientes fases:

- Extracción de la biopelícula del material de relleno.
- Aislamiento de microorganismos mediante cultivo en medios selectivos.
- Selección de microorganismos desnitrificantes.

- Identificación de las bacterias.
- Caracterización de la actividad desnitrificante.

IV.1.1.- Extracción de la biopelícula del material de relleno.

El material soporte fue extraído del interior del filtro sumergido a través de varios muestreadores colocados a diferentes alturas del cilindro central del filtro sumergido. La extracción se realizó con una cuchara cóncava de 30 cm de longitud (permitía tomar material a lo largo de todo el diámetro del cilindro).

Muestras de 1 gramo de relleno procedentes de diferentes alturas del biocilindro, se mezclaron en un erlenmeyer de vidrio completamente estéril. La muestra así obtenida se empleó para el aislamiento de los microorganismos desnitrificantes. Para ello se introdujo una muestra (1 g.) del material de relleno mezclado en un erlenmeyer con 100 ml de solución salina estéril (0.9% en NaCl). La biopelícula se separó del material de relleno mediante sonicación no superior a 1 minuto, para evitar la destrucción celular (Lazarova *et al*, 1994) facilitando posteriormente su disgregación mediante agitación a 700 r.p.m. empleando un agitador magnético. Se obtiene de este modo una suspensión formada por los microorganismos presentes en la biopelícula, así como restos del propio material soporte, que al ser de material cerámico puede disgregarse en parte por los métodos empleados. A partir de esta suspensión se procederá al aislamiento de bacterias desnitrificantes.

IV.1.2.- Aislamiento de microorganismos mediante cultivo en medios selectivos.

Entre la biota presente en la biopelícula podemos encontrar gran diversidad de bacterias desnitrificantes, al ser las condiciones de funcionamiento del sistema óptimas para su proliferación, sin embargo no son los únicos microorganismos presentes, lo cual nos obliga a seleccionar las bacterias de entre las existentes en la suspensión. Para ello emplearemos un medio de cultivo adecuado para el crecimiento de bacterias desnitrificantes, siendo las condiciones de incubación igualmente óptimas para este tipo de bacterias. Se elimina de este modo la presencia de muchos otros microorganismos al no poder desarrollar en las condiciones de cultivo.

El medio de cultivo seleccionado fue el Nitrato-Sacarosa-Agar modificado a partir del descrito por Rodina (1972), cuya composición por litro de agua destilada es la siguiente:

NaNO ₃	2.0 g.
K ₂ HPO ₄	1.0 g.
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0.5 g.
KCl	0.5 g.
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0.01 g.
Extracto de levadura	1.0 g.
Sacarosa	30.0 g.
Agar-Agar	20.0 g.

El pH del medio de cultivo fue el óptimo para las bacterias desnitrificantes (7.2), presentando abundante cantidad de nitrato y sacarosa como fuente de carbono, un compuesto fácilmente metabolizable por estos microorganismos. El medio así preparado se esterilizó mediante autoclave de vapor a 105 °C durante 30 minutos, se atemperó a 50 °C y se vertió en placas Petri estériles (20 ml/placa). Una vez solidificado el medio se empleó en la inoculación.

Este medio de cultivo fue inoculado con 0.1 ml de diferentes diluciones seriadas, realizadas por la gran cantidad de microorganismos presentes en la suspensión obtenida a partir de la biopelícula. Las diluciones empleadas oscilaron entre 10⁻⁴ a 10⁻⁸ realizando 5 réplicas de cada una de ellas. Todas las diluciones se realizaron en tubos de solución salina (0.9% en NaCl) con un contenido de 9 ml/tubo sobre los cuales se añadía 1 ml de la suspensión diluida inmediatamente más concentrada. El medio inoculante fue distribuido de forma homogénea por toda la superficie de la placa empleando una espátula de vidrio en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar).

La incubación se realizó a 30 ± 1 °C en total oscuridad durante un período de una semana, en total ausencia de oxígeno. Para ello se emplearon campanas de anaerobiosis, utilizando el sistema ANAEROGEN[®] para eliminar todo el oxígeno presente en el interior de la campana y azul de metileno como indicador de anaerobiosis.

Una vez finalizado el período de incubación se abrieron las campanas, seleccionando aquellas placas que presentaban un número de colonias que oscilaba entre 10 y 100. De cada una de las morfologías coloniales observadas se obtuvo un cultivo puro para 5 cepas diferentes realizando la siembra en el mismo medio de cultivo empleado para el aislamiento. El cultivo se realizó en aerobiosis lo cual permitía seleccionar aquellas cepas capaces de crecer tanto en ausencia como en presencia de oxígeno.

IV.1.3.- Selección de microorganismos desnitrificantes.

A pesar de las condiciones previas de aislamiento, no todas las bacterias aisladas son desnitrificantes, por lo cual se hace preciso realizar una fase de caracterización de cada una de las cepas obtenidas con la idea de asegurarnos que son verdaderos desnitrificantes. La forma seleccionada para este ensayo fue el control de la producción de gas tras el crecimiento de la bacteria en el medio nitrato-sacarosa-agar semi-sólido cuya composición tan solo varía en la concentración de agar que tan solo es de 6 g.. Este medio de cultivo es preparado en tubos 5 mm y para la inoculación se procede del siguiente modo:

- Regeneración del tubo mediante calentamiento a 100 °C en baño María. Esto permite mantener el medio en forma líquida eliminando el contenido de oxígeno de éste.
- Enfriamiento rápido del medio de cultivo mediante sumergido en hielo (-20 °C) para conseguir una inmediata solidificación.
- Inoculación en profundidad mediante picadura, empleando un hilo de platino, a partir de un cultivo puro de 24 horas.
- Sellado inmediato del tubo con parafina líquida estéril (110 °C/ 1 hora).

Estos tubos son incubados así durante 48 horas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad, considerando positivos aquellos que presentaban el medio roto debido a la producción de gas. Las cepas que no dieron positiva esta prueba no fueron consideradas desnitrificantes y se rechazaron.

IV.1.4.- Identificación de las bacterias.

Para la identificación taxonómica de todas las cepas desnitrificantes aisladas se siguieron las descripciones morfológicas y las características bioquímicas indicadas en el manual Bergey's (Buchanan and Gibbons, 1984; Kersters and de Ley 1984) así como por Jeter and Ingraham (1981). Las determinaciones que se realizaron fueron: Morfología celular, Tinción de Gram, movilidad, oxidasa, ureasa, β -galactosidasa, reducción de nitrato a nitrógeno molecular, hidrólisis de la esculina, producción de PHB, crecimiento a 40 °C, , hidrólisis del almidón, producción de pigmentos fluorescentes, arginina dihidrolasa, y crecimiento con diferentes fuentes de carbono (sacarosa, glucosa, etanol, D-xilosa, maltosa, manitol, etilén glicol, 2,3 butylén glicol, geraniol, azelato, levulinato, glicolato, L-serina, L-arginina, L-histidina, Betaina y sarcosina).

Tras estas pruebas fueron cinco las diferentes bacterias que se aislaron, perteneciendo la mayoría de ellas al género *Pseudomonas*. Las especies aisladas fueron *P. mendocina*; *P. fluorescens*; *P. pickettii*; *P. alcaligenes* y *Agrobacterium radiobacter*. Las características descritas para cada cepa se reflejan en la tabla IV.1.

IV.1.5.- Caracterización de la actividad desnitrificante.

Cada una de las cepas aisladas fueron analizadas en cuanto a su capacidad de eliminar nitrato de forma desasimilatoria, transformándolo en N_2 , empleando para ello el método de Yoshinari y Knowles (1976). Este método consiste básicamente en hacer crecer la bacteria en anaerobiosis, pero en presencia de una atmósfera con un 10% de acetileno, que inhibiría la actividad óxido nitroso reductasa evitando así la transformación de N_2O en N_2 un gas difícilmente medible por su alto porcentaje en el medio.

Tabla IV.1.- Identificaciones taxonómicas para cada una de las cepas desnitrificantes aisladas

	<i>P. mendocina</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. pickettii</i>	<i>Ag. radiobacter</i>	<i>P. alcaligenes</i>
Morfología celular	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos
Tinción de Gram	Gram -	Gram -	Gram -	Gram -	Gram -
Movilidad	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+
Ureasa	-	-	-	-	-
β -galactosidasa	-	-	-	+	-
NO ₃ ⁻ a N ₂	+	+	+	+	+
Hidrólisis esculina	-	-	-	+	-
Acumulación PHB	-	-	+	-	-
Crecimiento a 40°C	+	-	+	-	+
Hidrólisis almidón	-	-	-	-	-
Pig. fluorescentes	-	+	-	-	-
Arg. dihidrolasa	+	+	-	-	+
Sacarosa	+	+	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+
D-xilosa	-	-	+	+	+
Maltosa	-	-	-	+	-
Manitol	-	+	-	+	-
Etilén glicol	+	-	-	+	-
Butilén glicol	-	+	-	+	-
Geraniol	+	-	-	-	-
Azelato	+	+	+	-	-
Levulinato	+	-	+	-	+
Glicolato	+	-	+	-	-
L-serina	+	+	+	-	-
L-arginina	+	-	-	-	+
L-histidina	+	-	-	-	-
Betaina	+	-	-	-	-
Sarcosina	+	-	-	-	-

Para esta determinación se prepararon viales de liofilización conteniendo 5 ml del medio nitrato-sacarosa modificado, sin presencia de agar. La composición del medio de cultivo fue:

NaNO ₃	3.0 g.
K ₂ HPO ₄	1.0 g.
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0.5 g.
KCl	0.5 g.
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0.01 g.
Sacarosa	2.0 g.

En este caso se empleó un medio definido del que se elimina el extracto de levadura, se incrementa la presencia de nitrato y se reduce la concentración de sacarosa. Esto permite reducir la formación de CO₂ el cual puede afectar a la determinación de N₂O. A medio se le ajustó el pH hasta un valor de 7.2.

Los viales de liofilización se esterilizaron previamente mediante calor seco (Horno Pasteur) los cuales quedaron herméticamente cerrados al colocarles tapones de cierre esterilizados. El medio de cultivo fue introducido en el interior del vial a través de un sistema Swinex (Millipore[®]) o filtro esterilizante de 0.22 µm. El aire del interior fue retirado por arrastre con He durante 5 minutos, el cual se introdujo a través de una aguja de 12 cm que permitió introducir el gas directamente en el interior del líquido. El escape del gas arrastrado se realizó a través de una aguja de escape. Una vez conseguida la atmósfera de He se retiró un 10 % de la atmósfera interior, reemplazándola por acetileno. Los viales así preparados, fueron inoculados con 0.1 ml de una suspensión (0.5 de la escala de Mc. Farland) preparada en solución salina (0.9% NaCl) estéril a partir de un cultivo puro de la cepa a ensayar.

Los viales inoculados se incubaron en la oscuridad durante 12 horas a 30 ± 1°C, período tras el cual se determinó la presencia de N₂O mediante cromatografía gaseosa. Para ello se empleó un cromatógrafo de gases Varian[®] Star 3400 CX equipado de un horno universal para termostatación de los inyectores, inyector "On column" para columnas empacadas (1040), columnas empacadas Porapak[®] 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. La temperatura del inyector fue de 150°C (muestras gaseosas), la temperatura del horno fue de 50°C y la del detector de 150°C. El gas de arrastre fue igualmente He a una presión de 14 p.s.i.

Tras el período de incubación se tomó una muestra de 0.25 ml empleando una jeringa con aguja de 0.33 x 13 mm (Becton and Dickinson®) inyectándola de forma inmediata en el cromatógrafo. Los gases contenidos fueron arrastrados por el He hasta la columna empacada que los separaba por afinidad del material de relleno. El detector remitía señal al integrador que registraba un área a 3.2 minutos correspondiente a la concentración de N₂O. A los 7 minutos se registraba el área de la concentración de acetileno, que tras comprobar que se correspondía con el 10% del total de la atmósfera interior se daba por válido el análisis.

Para conocer la concentración de N₂O y así establecer la mayor o menor actividad desnitrificante del microorganismos ensayado se preparó un patrón pinchando 1 ml de N₂O purísimo (Abelló Linde S.A.) en un tubo de 10 ml herméticamente cerrado al cual se le extrajo previamente 1 ml del aire contenido en el interior. Con este patrón se conseguía un patrón de 4464 moles/l del cual se pinchó en el cromatógrafo una muestra de 0.25 ml. La concentración se calculó mediante comparación de áreas.

Para evitar valores anómalos debido al posible mayor o menor crecimiento de un microorganismo en el medio de cultivo empleado, tras el análisis de la concentración de N₂O se realizó un recuento del número total de microorganismos presentes en el vial. Para ello se procedió tal como se comentó anteriormente, realizando diluciones seriadas e inoculando el medio nitrato-sacarosa-agar. Una vez conocida la masa bacteriana total, se calculó la actividad desnitrificante en $\mu\text{moles}/10^9$ bacterias por hora. Los valores obtenidos se reflejan en la tabla IV.2. Los valores obtenidos son medias de las concentraciones obtenidas para las cinco cepas aisladas de cada especie desnitrificante encontradas en la biopelícula.

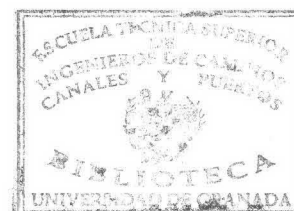


Tabla IV.2.- Actividad desnitrificante de las cepas aisladas en la biopelícula y utilizadas en la investigación como inoculantes selectivos.

Especie bacteriana	Actividad $\mu\text{moles}/10^9$ bacterias por hora
<i>P. mendocina</i>	828
<i>Ag. radiobacter</i>	827
<i>P. fluorescens</i>	277
<i>P. pickettii</i>	259
<i>P. alcaligenes</i>	76.7

IV.2.- CONSERVACIÓN DE LOS INOCULANTES.

Todas las cepas obtenidas como desnitrificantes fueron conservadas mediante liofilización, para su posterior aplicación como inoculantes del filtro sumergido.

Para la liofilización, la cepa se hizo crecer en un medio de cultivo nutritivo como es el caldo del tripticasa, soja agar (T.S.A. Difco[®]), preparado en tubos en forma de pico de flauta. Para la preparación del medio se llevó a ebullición agua destilada adicionada del medio de cultivo deshidratado (40 g/l). Este medio se repartió en tubos de 16 mm a razón de 5 ml/tubo y se esterilizó al autoclave a 102°C durante 30 minutos. El tubo se dejó inclinado para la solidificación de este a modo de pico de flauta. Sobre este medio de cultivo se sembraron las cepas a conservar realizándose el crecimiento durante 18 horas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad.

Para la liofilización se precisa un crioprotector, empleándose en este caso leche descremada (Difco[®]). Este medio se preparó resuspendiendo el deshidratado (76 mg/l) y añadiéndolo en tubos de 16 mm a razón de 4 ml/tubo. Se esterilizó durante 15 minutos a 120°C desechando aquellos tubos con aspecto de caramelización (color oscuro). El crioprotector se añadió sobre el cultivo crecido en fase exponencial resuspendiendo todo el crecimiento bacteriano en la leche descremada ayudándonos de una pipeta estéril. Una vez realizada la suspensión se repartió esta en viales de liofilización estériles a razón de 1 ml por vial, cerrándolos con tapón de goma estéril.

Los viales así obtenidos se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ liofilizándolos posteriormente en un liofilizador LABCOMCO[®] mediante la aplicación de alto vacío a $-43\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Tras cerrar los viales en el interior del liofilizador, estos se aseguraron con arandela metálica y se guardaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la oscuridad. Estos liofilos pueden permanecer viables durante algo más de 2 años.

Para recuperar el microorganismo se empleó el medio nutritivo caldo de tripticasa-soja (Difco[®]) el cual se preparó resuspendiéndolo en agua destilada (30g/l) repartiéndolo en tubos de 16 mm a razón de 5 ml/tubo y esterilizándolo a $102\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos mediante autoclave de vapor. Este medio se añadió a los viales mediante jeringa estéril (el vacío del vial debe notarse al succionar el medio de cultivo) y tras resuspender el liofilo se tomó parte, mediante jeringa estéril, añadiéndolo a un nuevo tubo de caldo de tripticasa soja. El tubo así inoculado se incubó durante 24 horas a $30 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ en oscuridad. Una vez crecido el cultivo se realizó un aislamiento en medio sólido sacarosa-nitrato-agar indicado anteriormente, obteniendo de nuevo un cultivo puro.

IV.3.- INOCULACIÓN DEL SISTEMA

Para la inoculación del sistema con cada una de las cepas bacterianas empleadas en la investigación, se seleccionó un medio de cultivo lo más parecido posible al agua a tratar por parte de la tecnología propuesta. Este medio tenía como base el propio agua de pozo a tratar, la cual se calentó previamente al baño María para eliminar posibles precipitados de CaCO_3 . La composición del medio por litro de agua de pozo fue:

NaNO_3	4.0 g.
K_2HPO_4	1.0 g.
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g.
KCl	0.5 g.
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.01 g.
Etanol	1.61 ml.

Para su preparación se partía del agua de pozo descarbonatada, la cual se había analizado previamente para conocer su composición en cada uno de los componentes indicados en la fórmula. A continuación se disolvían las cantidades necesarias de cada uno de estos compuestos para alcanzar la concentración deseada. Una vez añadidos todos los componentes, el medio se esterilizó, añadiendo al final el etanol correspondiente en condiciones de esterilidad. El pH final del medio fue de 7.2, el cual precisó ajustarse mediante adición de HCl.

Previo a la fase de inoculación del sistema, se realizaron curvas de crecimiento del microorganismo en el medio de cultivo a emplear. Para ello se preparó el medio anteriormente descrito en frascos erlenmeyer, conteniendo cada uno 100 ml.

A partir de un cultivo puro de la cepa a inocular se preparó una suspensión bacteriana en solución salina estéril (0.9% NaCl) alcanzando el valor 0.5 de la escala de Mc Farland. Con esta suspensión se inocularon todos los matraces (6 en total) adicionando 0.1 ml. Los seguimientos se realizaron para 0, 15, 24, 39, 48 y 72 horas estableciendo la curva de crecimiento en función del incremento de la turbidez en el medio. Una vez inoculados todos los matraces se introdujeron en un agitador orbital (120 r.p.m.) a $30 \pm 1^\circ \text{C}$.

Para la determinación de la turbidez se empleó un espectrofotómetro HITACHI® realizando las determinaciones a una longitud de onda de 650 nm y empleando agua bidestilada como blanco. Las medidas se realizaron empleando cubetas de cuarzo de 1 cm² de sección.

Todos los microorganismos desnitrificantes empleados crecían de forma más rápida en presencia de oxígeno, que en presencia de nitrato, razón por la cual los crecimientos previos a la inoculación de la columna se realizaron en agitación. En ningún momento se alteró su actividad desnitrificante al crecer en forma aerobia.

Una vez establecido el tiempo necesario para alcanzar la fase intermedia del crecimiento exponencial, la inoculación se realizó sobre 1.5 l de medio de cultivo, siguiendo los pasos indicados anteriormente y parando la incubación en el tiempo establecido como de fase de crecimiento exponencial.

El filtro sumergido a escala de laboratorio con el material de relleno en su interior (descripción del sistema en la investigación de choque) se cubrió en todas sus aperturas con papel aluminio, cerrando las entradas y salidas mediante una guillotina. La columna así preparada se esterilizó en autoclave de vapor a 120 °C durante 30 minutos. Con esto nos asegurábamos la ausencia de microorganismos en el material de relleno antes de la inoculación. Todos los tubos y conexiones a emplear en la puesta en marcha del sistema fueron igualmente esterilizados.

Una vez crecido el cultivo bacteriano, este se conectó a la columna mediante bomba peristáltica, siendo el recipiente que contenía el cultivo, receptor del recirculado. Este proceso se mantuvo en circuito cerrado durante el tiempo considerado para la inoculación (tiempos de recirculación de 1, 3, 5 y 9 días).

A lo largo de la fase de inoculación se tomó de forma diaria 1 ml del recirculado con la idea de conocer la concentración bacteriana que se mantenía y la posible presencia de contaminación en el proceso. Para ello se realizaron diluciones seriadas de la muestra tomada, procediendo de igual modo que en la fase de aislamiento de microorganismos comentada en el apartado IV.1.

Tras la incubación se contaron las colonias formadas por el microorganismo inoculante para conocer la concentración de éste. La presencia de otras colonias ponía de manifiesto una contaminación en el proceso, lo cual fue factor delimitante para rechazar la experiencia.

Debido a los bajos valores de crecimiento obtenidos en el cultivo y con ello a la mala inoculación resultante del sistema, se optó por variar el medio de cultivo utilizando el medio sacarosa-nitrato en forma líquida para proceder a la inoculación.

Con la idea de comparar los sistemas, se realizó una inoculación a escala de laboratorio con licor mezcla procedente del reactor de fangos activos de la estación depuradora Puente de los Vados (Granada). Esta inoculación fue análoga a las realizadas con los cultivos puros, a excepción de las fases de crecimiento del cultivo. Igualmente se realizó un control de los microorganismos presentes en el recirculado, siguiendo igual método que para los cultivos bacterianos.

IV.4.- ESTUDIOS SOBRE LA FORMACIÓN Y ACTIVIDAD DE LA BIOPELÍCULA.

IV.4.1.- Estudio de composición microbiológica de la biopelícula.

Una vez finalizado el proceso de inoculación se estudió el contenido de microorganismos sobre el relleno. Para ello justo tras finalizar esta primera fase se tomó material de relleno del interior de la columna, a partir del cual se realizó una extracción de la biopelícula y un recuento de bacterias. Para ello se siguió el proceso descrito por Lazarova *et al* (1994) y comentado en el apartado IV.1.

Tras la inoculación de la columna se puso en marcha el sistema con un valor de carga hidráulica variable, utilizando agua de pozo con las siguientes características:

NO ₃ ⁻	100 mg/l
NO ₂ ⁻	0.0 mg/l
PO ₄ ³⁻	0.6 mg/l
O ₂	0.0 mg/l
SO ₄ ²⁻	180.0 mg/l
pH	7.5

Este agua fue preparada a partir de agua de pozo a la cual se le incrementaron las concentraciones de algunos componentes hasta alcanzar los indicados.

Tras el funcionamiento del sistema se volvió a muestrear la biopelícula realizando el mismo ensayo para conocer los microorganismos presentes en el sistema. La comparativa de valores permitió conocer la estabilidad así como el grado de contaminación de la biopelícula formada.

IV.4.2.- Estudios de microscopía de barrido de superficie.

Mediante estos ensayos, que permiten visualizar la biopelícula sin necesidad de alterarla, se pueden obtener datos sobre la formación o no de biopelícula así como de su estructura. Igualmente permiten conocer la posible contaminación del sistema. El método realizado fue descrito previamente por Lazarova *et al* (1994 b).

El material de relleno (1 g.) inmediatamente tras su extracción de la columna fue colocado en un vial de liofilización completamente estéril y cubierto con una solución de glutaraldeido a 3% lo cual permitía fijar por completo la biopelícula al material soporte manteniendo ésta la misma estructura. Estos viales perfectamente tapados se guardaron hasta su análisis en lugar fresco y seco y en ausencia de luz.

Previo a la visualización microscópica el material de relleno fue aclarado y tratado con una solución de óxido de osmio al 1% durante un tiempo de 3 horas. Posteriormente se realizó una deshidratación mediante tratamiento y aclarado en un gradiente de alcohol (30, 50, 70 90 y 100%). Finalmente las muestras se secaron hasta el punto crítico colocándolas en el porta objetos del microscopio.

El equipo utilizado fue un microscopio de barrido de superficie (Hitachi®) equipado con mallado de oro. Mediante observaciones de diferentes esquistos arcillosos se apreció el grado de formación de la biopelícula, así como la estructura de esta. Para cada ensayo realizado se realizaron fotografías representativas del estado y forma de la biopelícula. Estas fotografías fueron digitalizadas en negativo empleándose de esta forma en la investigación.

IV.4.3.- Estudios sobre la actividad de la biopelícula.

Para conocer la actividad de la biopelícula se procedió a conocer la capacidad de formar esta N₂O a partir de un medio de cultivo definido, rico en nitrato, siguiendo el método de Yoshinari y Knowles (1976) descrito en el apartado IV.1. En este caso el proceso se desarrolló igualmente en viales de liofilización cerrados herméticamente con algunas variantes.

El material de relleno, recién extraído del filtro sumergido se introdujo en el vial de liofilización completamente estéril (0.5 g aproximadamente). La cantidad de material se conoció por la diferencia de peso de vial antes y después de introducir el material. Una vez introducido el material se cerró herméticamente añadiendo el medio de cultivo definido de igual forma que se indicó en el apartado IV.1.

Empleando una jeringa estéril se extrajo todo el aire del interior del tubo (el líquido presentaba burbujeo por a pérdida de gases disueltos). En estas circunstancias el vial se llenó de He con una leve sobrepresión para evitar la entrada de aire. Del interior se extrajo el 10% del contenido de He introduciendo acetileno. En estas condiciones se incubó en la oscuridad a 30 ± 1 °C durante 24 horas. Tras la incubación se determinó la concentración de N_2O , expresando los resultado como $\mu\text{moles/gramo}$ de relleno.

Los resultados obtenidos tras la inoculación se compararon con los obtenidos tras el tratamiento de agua subterránea contaminada, dando idea del mantenimiento de la actividad desnitrificante en la biopelícula.

IV.5.- ESTUDIOS DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL AGUA TRATADA.

Estos ensayos estaban destinados a conocer la idoneidad del sistema en la eliminación de nitrógeno del agua contaminada, por lo que se estudiaron las concentraciones nitrato a lo largo de todo el funcionamiento del biofiltro tras la recirculación. Igualmente y debido al diferente comportamiento de los desnitrificantes a nivel enzimático, se estudió la presencia de nitrito en el agua tratada.

Debido a que uno de los problemas de estos sistemas es la aportación al agua tratada de masa bacteriana así como materia orgánica (principalmente de forma coloidal) se estudió la evolución de la turbidez en el agua tratada a lo largo del funcionamiento del sistema. Igualmente se analizaron las concentraciones de bacterias, haciendo hincapié en la posible presencia de patógenos estudio comparativo con los ensayos de inoculación con licor mezcla)

IV.5.1.- Determinación de la turbidez

La turbidez del agua está producida por la presencia de diferentes partículas en suspensión o de tipo coloidal como arcillas, lodo, herrumbre, materias orgánicas e inorgánicas finamente divididas, algas, bacterias u otros microorganismos. La presencia de esta materia particulada no permitirá la transmisión de la luz en línea recta a través de la muestra de agua, absorbiéndose o dispersándose la luz, lo cual da lugar al aspecto turbio. Para nuestro tipo de muestras la turbidez fue consecuencia del desprendimiento de bacterias y restos orgánicos procedentes de la biopelícula.

El método empleado fue el espectrofotométrico, el cual consiste en la medida de la intensidad de luz absorbida a una determinada longitud de onda y su comparación con un patrón de turbidez. En este método es necesario seleccionar una longitud de onda para la cual la absorbancia de la intensidad de luz por las partículas sea máxima, siendo en este caso $\lambda = 650$ nm. Las unidades empleadas fueron las de referencia para turbidez o Unidades Nefelométricas (UNT) empleando la formacina como sustancia que da lugar a una suspensión de referencia estándar (APHA, 1992).

La suspensión de formacina se preparó diariamente, debido a que es poco estable. Para su formación se precisó mezclar de los siguientes reactivos:

- Solución de Sulfato de Hidracina $(\text{NH}_2)_2\text{-H}_2\text{SO}_4$ (1 g./100 ml). Esta solución se guardó en frío (4°C) siendo estable durante un mes. Esta sustancia merecía especial atención en su manipulación debido a su carácter cancerígeno.
- Solución de Hexametenotetraamina $(\text{CH}_2)_6\text{-N}_4$: (10 g./100 ml). Esta solución se conservó en frío (4°C), siendo estable durante un mes.

A partir de estas dos soluciones se preparó el patrón de formacina, para lo cual se mezclaron 5 ml de la solución de sulfato de hidracina con 5 ml de solución de hexametenotetraamina. Esta mezcla se mantuvo en contacto durante 24 horas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Tras este tiempo se diluyó hasta 100 ml, formando así una suspensión de formacina (aspecto lechoso) con una concentración de 400 UNT. Esta suspensión era estable en frío durante 15 días.

A partir de la suspensión madre de formacina se prepararon diferentes patrones (0.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, y 10.0 UNT) mediante dilución con agua bidestilada con los que se obtuvo la curva de calibración. Para valores mayores a los empleados en la curva, se preparó una nueva de concentraciones más altas. La curva se preparó empleando mínimos cuadrados para el cálculo de la ecuación de la recta. Curvas con coeficiente de correlación inferior a $r = 0.99$ se despreciaron, pasando a realizarla de nuevo.

Una vez obtenida la recta de calibración se analizaron cada una de las muestras, sometiéndolas previamente a sonicación durante 2 segundos, para eliminar las burbujas de aire presentes en la muestra que podían alterar la medida. Se prestó especial atención a los tubos empleados en el ensayo, los cuales debían estar perfectamente limpios y secos y no debían estar rayados (estos tubos fueron desechados).

IV.5.2.- Determinación de nitrato.

La determinación del nitrato (forma más oxidada del nitrógeno) encuentra como principal problema las variadas interferencias que se pueden dar. La turbidez dificulta este tipo de determinaciones, al igual que la presencia de altas concentraciones de nitrito, hierro (II y III), Manganeseo (IV) o presencia de cloro. Es por lo tanto indispensable la filtración de la muestra de agua residual en la cual se pretende realizar la determinación, así como eliminar las posibles interferencias.

Para aguas limpias, como es el caso de nuestra investigación, podemos contar con un método espectrofotométrico en el rango del ultravioleta (Método adecuado hasta concentraciones de $10 \text{ mg NO}_3^- \text{-N /l}$).

En este caso no es posible analizar las muestras con alta concentración en materia orgánica, por lo que está perfectamente justificada la filtración previa para evitar igualmente esta interferencia, debido a los restos desprendidos de la biopelícula. La materia orgánica absorbe a igual longitud de onda que el nitrato, por que debemos contabilizar esta posible interferencia.

El método se basa en la absorción de luz ultravioleta por parte del nitrato (220 nm), lo cual nos permite una determinación rápida y sencilla. Para evitar la interferencia de la materia orgánica, la cual absorbe también a 275 nm, se realizó una segunda medida de absorbancia a esta longitud de onda, para corregir la inicial.

Previo a la determinación se preparó una curva de calibración mediante diluciones de una solución madre de nitrato (0.1 mg N/ml). Para ello se secó KNO_3 en horno de desecación a 105°C durante 24 horas. Tras su enfriamiento se disolvieron 0.7218 gramos de nitrato potásico anhidro en un litro de agua bidestilada. Esta solución se conservó con 2 ml de cloroformo (CHCl_3), siendo así estable durante 6 meses.

A partir de la solución patrón madre se prepararon diferentes diluciones (1.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 y 25.0 mg N/l) con las cuales se determinó la curva de calibración. La recta se calculó por mínimos cuadrados, despreciando aquellas curvas con coeficiente de correlación inferior a $r = 0.99$.

Tanto para los patrones como para la muestra (previamente filtrada a través de filtros de $0.45 \mu\text{m}$), se tomaron 50 ml sobre los cuales se añadió 1 ml de HCl 1 N. Inmediatamente se midió la absorbancia a 220 nm empleando cubetas de cuarzo de 1 cm^2 de sección. Igualmente se realizó una medida de la absorbancia a 275 nm (materia orgánica). El valor de la absorbancia obtenida a 275 nm se restó 2 veces al valor obtenido a 220 nm, empleando este para calcular la concentración de nitrato. Cuando el valor de corrección fue superior al 10% de la lectura a 220 nm se despreció el dato.

IV.5.3.- Determinación de nitrito.

La determinación de nitrito se realizó de forma colorimétrica, teniendo en cuenta también las posibles interferencias, destacando la presencia de turbidez que se eliminaron mediante filtración. El método empleado fue el de la sulfanilamida con el que se pueden realizar determinaciones de hasta 0.2 mg de NO_2^-/l . Para mayores concentraciones se realizaron diluciones. Debido a la inestabilidad del nitrito, su análisis se realizó inmediatamente tras la toma de muestra.

Este método se basa en la reacción del nitrito con sulfanilamida en presencia de diclorhidrato de N-(1 naftil)-etilendiamina y en medio ácido fuerte, dando lugar a un compuesto de color púrpura rojizo cuya intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de nitrito hasta aproximadamente 0.2 mg/l. El color desarrollado es estable durante al menos 2 horas.

Para esta determinación se empleó el reactivo de Sulfanilamida. Para su preparación se añadieron sobre 800 ml de agua destilada 100 ml de ácido fosfórico (85%), disolviendo completamente 10 gramos de sulfanilamida. Tras la completa dilución del anterior reactivo se disolvió 1 gramo de Diclorhidrato de N-(1 naftil) etilendiamina, enrasando hasta 1000 ml. El reactivo se conservó en frasco topacio y refrigerado, siendo así estable durante un mes.

Igualmente se preparó una curva de calibración, partiendo de una solución madre de nitrito (100 mg NO_2^- -N /l.). Para ello se desecó Nitrito sódico en estufa de desecación durante al menos 1 hora a 105°C. Una vez seco se disolvieron 0.4928 gramos de nitrito sódico en un litro de agua bidestilada. Para conservarlo se añadió 1 ml de CHCl_3 . A partir de la solución patrón madre se obtuvo una dilución de 1mg/l diluyendo 100 veces la inicial. Esta se preparó de forma diaria debido a su inestabilidad.

A partir de la solución patrón de 1 mg/l se prepararon los patrones, empleados para obtener la curva de calibración (0.01, 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.1, 0.12, 0.14, 0.16, 0.2 mg NO_2^- -N/l) La recta se calculó por mínimos cuadrados, despreciando aquellas curvas con coeficiente de correlación inferior a $r = 0.99$.

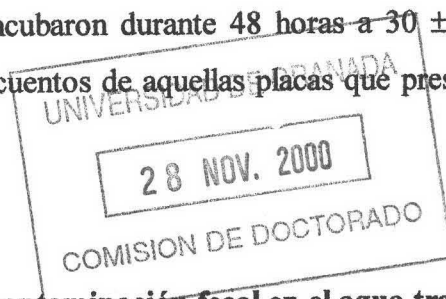
Tanto para la muestra como para los patrones se tomaron 50 ml de muestra, ajustándole el pH entre 5 y 9. Para ello se empleó HCl o NH_4OH según fue necesario y papel indicador para controlarlo. Sobre esta muestra se añadieron 2 ml del reactivo de sulfanilamida, agitando y dejando 10 minutos en reposo. Tras este tiempo se midió la absorbancia a 543 nm en cubetas de 1 cm^2 de sección. Los valores de nitrito se calcularon sustituyendo en la ecuación de la recta.

IV.5.4.- Determinación de microorganismos totales en el agua tratada.

De los sistemas de biopelícula pueden desprenderse microorganismos que aparecerán en el agua tratada, empeorando de este modo sus características de potabilidad. Mayoritariamente estos microorganismos eran aquellos con los que se inoculó el biofiltro o bien aquellos que presentes en el agua subterránea a tratar colonizaron la columna.

Para su determinación se realizó un recuento en placa, a partir del propio agua tratada, empleando como medio de cultivo el Nitrato-Sacarosa-Agar modificado, comentado en el apartado 1,1,2.- de esta metodología. Para cubrir todo el rango de concentraciones posibles se realizaron diluciones seriadas (solución salina 0.9%).

Sobre la superficie de la placa Petri, se extendieron, ayudándonos de espátula de vidrio, 0.1 ml del efluente obtenido del filtro sumergido o de la dilución realizada (10^{-1} , 10^{-2} o 10^{-3}). Las placas así preparadas se incubaron durante 48 horas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad, realizando tras este tiempo los recuentos de aquellas placas que presentaban un número de colonias entre 10 y 100 ufc.



IV.5.5.- Determinación de indicadores de contaminación fecal en el agua tratada.

Debido a la inoculación de columnas con Licor Mezcla procedente del reactor biológico de una Estación Depuradora y al desprendimiento de microorganismos que puede producirse desde la biopelícula, se realizó un control de indicadores de contaminación fecal, que al igual que muchos patógenos pueden asociarse a la biopelícula desnitrificante, desprendiéndose posteriormente al medio.

De entre los posible indicadores de contaminación fecal se seleccionó la determinación de coliformes totales, indicadores presentes en las aguas residuales y cuya determinación analítica está muy estandarizada, siendo este grupo de microorganismos empleado por cerca de 100 años para asesorar de la presencia de patógenos entéricos en las aguas (Hutchinson and Ridgway, 1977).

Para este análisis se empleó el método de filtración por membrana, utilizando como medio de cultivo m-Endo agar, cuya composición por litro de agua destilada es la siguiente:

Extracto de levadura	1.5g.
Casitona	5 g.
Tiopeptona	5 g.
Triptosa	10 g.
Lactosa	12.5g.
Desoxicolato de sodio	0.1 g.
K ₂ HPO ₄	4.375 g.
KH ₂ PO ₄	1.375 g.
NaCl	5 g.
Lauril sulfato sódico	0.05 g.
Na ₂ SO ₃	2.10 g
Fuscina básico	1.05 g.
Agar	15 g.

Para su determinación se tomó la muestra en frascos estériles de vidrio (autoclave de vapor 120°C 30 minutos), realizando el análisis de forma inmediata. El agua así tomada se filtró (100 ml) a través de membranas estériles de 0.45µm de tamaño de poro (Tipo HA Millipore®). Para la manipulación del filtro se emplearon pinzas esterilizadas, mediante sumergido en alcohol de 96% y flameadas a la llama. Todo el material del equipo de filtración estaba completamente esterilizado mediante autoclave.

Mediante una bomba de vacío se pasó el agua a través de la membrana, quedando las bacterias retenidas en el filtro. Inmediatamente se colocó la membrana en una placa Petri conteniendo el medio m-Endo y se incubó a 37°C durante 24 horas en la oscuridad. Las placas se invirtieron para evitar la caída de agua de condensación sobre el filtro. Todas las colonias que presentaron brillo metálico se contabilizaron como coliformes totales, expresando los resultados como ufc/100 ml.

IV.6.- IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA MEDIANTE AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN PARCIAL DEL GEN CODIFICANTE DEL ARN RIBOSÓMICO 16S (rADN 16 S).

Debido a la necesidad de conocer de forma exacta el tipo de microorganismo que se empleó en la columna semi-técnica, a modo de garantizar la calidad sanitaria final del agua obtenida y evitar los posibles problemas epidemiológicos que podría desencadenar la aplicación de un microorganismo patógeno en este tipo de tratamientos, se procedió a realizar una caracterización de la cepa bacteriana identificada previamente como *Ag. radiobacter*.

Los métodos bioquímicos empleados en la caracterización previa, presentan una fiabilidad del 75 %, razón por la cual se empleó la homología de RNA que presenta una fiabilidad del 99%. Los datos desprendidos de este ensayo se compararon con las pruebas bioquímicas aplicadas.

Para la amplificación de la región hipervariable del rADN 16S, se ha empleado la pareja de cebadores fD1 y rD1, descritos previamente como adecuados para la amplificación en la mayoría de las eubacterias (Weisburg *et al.*, 1991). Los oligonucleótidos se sintetizaron en el Servicio de Síntesis del Instituto de Parasitología López-Neyra (CSIC, Granada).

La amplificación del rADN 16S de la cepa se efectuó tanto a partir de lisados celulares como a partir de ADN genómico. Los lisados celulares se obtuvieron mediante la suspensión de una pequeña cantidad de células procedentes de un cultivo fresco en placas de TSA, en 20 μ l de solución de lisis (NaOH 0.05 M, SDS 0.25 %), incubando a continuación esta suspensión a 100°C durante 15 minutos. El ADN genómico se obtuvo mediante extracción a partir de 5 ml de un cultivo de 24 h de la cepa en medio TSB, utilizando para ello el kit comercial "*AquaPure Genomic DNA isolation*" (BIORAD). La concentración del ADN de estas preparaciones se determinó por absorbancia a 260 nm, teniendo en cuenta que una dilución de ADN bicatenario de concentración 50 ng/ μ l tiene una absorbancia A=1 a una longitud de onda de 260 nm (Sambrook *et al.*, 1989).

Las reacciones de PCR se efectuaron en un volumen de 50 μ l, a partir de 4 μ l de lisado celular o de 100 ng de ADN genómico. Las condiciones de reacción, perfil de temperaturas y ciclos fueron descritos previamente (Vinuesa *et al.*, 1998). Las reacciones se efectuaron utilizando el kit comercial “*BioTherm DNA Polymerase*” de LABCLINICS (Barcelona, España). En cada mezcla de reacción se aplicaron:

1. 5 μ l de buffer 10x, suministrado con la enzima.
2. MgCl₂ 50 mM, suministrado con la enzima.
3. 200 μ M de cada uno de los dinucleótidos dATP, dAGP, dCTP y dTTP.
4. 20 pmoles de cada uno de los cebadores, rD1 y fD1.
5. 100 ng de ADN molde, o en su caso 4 μ l de lisado celular.
6. 1 U de enzima *Taq* polimerasa.
7. agua estéril calidad *Milli-Q*, hasta 50 μ l.

El programa de PCR se desarrolló empleando el termociclador PE-2400 (PERKIN-ELMER) y consistió en los siguientes pasos:

1. Desnaturalización inicial: 95°C durante 3 min. 30”
2. 35 ciclos consistentes en:
 - 2.1. Desnaturalización: 95°C durante 1 min. 10”
 - 2.2. Hibridación de los cebadores sobre molde desnaturalizado a 56°C durante 40”
 - 2.3. Extensión: 72°C durante 2 min.
3. Extensión final: 72°C durante 6 min. 10”
4. Mantener a 4°C

Tras la reacción, se tomaron alicuotas de 2 μ l que se chequearon en gel de agarosa al 0.8% para comprobar la existencia de bandas amplificadas del tamaño esperado (1.4-1.6 Kb). Una vez comprobadas, las muestras completas conteniendo la banda amplificada se corrieron en gel de agarosa al 0.8%, y el ADN de las bandas del tamaño correcto se extrajo de los fragmentos escindidos del gel mediante el kit comercial “*Quiaex II*” (QUIAGEN). La concentración del ADN extraído se determinó nuevamente mediante absorbancia a 260 nm.

La secuencia parcial del ADN amplificado purificado de los geles se obtuvo mediante secuenciación automática de ADN de doble cadena, en un secuenciador "Applied Biosystems ABI 373" (PERKIN-ELMER), utilizando el kit comercial "ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" (PERKIN-ELMER), efectuada en el Servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología López-Neyra (CSIC, Granada). Se utilizaron 100 ng de ADN molde y 5 pmoles de cebador (rD1 o fD1) en cada reacción de secuenciación. Las muestras se amplificaron por PCR en un termociclador PE 9600 (PERKIN-ELMER) y se pasaron por "Sephadex" G-50 para eliminar el exceso de terminadores no incorporados.

Las secuencias obtenidas para cada uno de los dos cebadores (fD1 y rD1) se procesaron con el software "Chromas" para PC con objeto de cribar los errores, y las secuencias se enviaron en formato FASTA para su comparación con las existentes en los bancos de datos, empleando el software FASTA v. 3.36 (Pearson y Lipman, 1988) a través del servidor de Internet EMBL FASTA del EBI (European Bioinformatics Institute, <http://www.ebi.ac.uk>)

IV.7.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Debido al carácter comparativo de los estudios realizados en la investigación de choque, todos los datos obtenidos se sometieron a tratamiento estadístico asistido por ordenador, realizando los siguientes tratamientos:

2ª fase de la Investigación de choque. Estudios de formación de biopelícula.

- Análisis de la Varianza (ANOVA) multifactorial, siendo el inoculante empleado la variable independiente y los parámetros analizados sobre el relleno (recuento de microorganismos y actividad desnitrificante) la variable dependiente. Como covariable se empleó el tiempo de recirculación. Igualmente se completó un Test de Mínimas diferencias Significativas (LSD) entre las medias y test de rango múltiple (t de Student) para la comparación por separado de las fuentes de variación en los análisis multifactor.

Para los estudios de funcionamiento de proceso:

- Análisis de la Varianza (ANOVA) multifactorial, siendo el inoculante empleado la variable independiente y los parámetros analizados en el efluente obtenido (nitrógeno total, nitrito, turbidez) la variable dependiente. Como covariable se empleó el tiempo de recirculación. Igualmente se completó un Test de Mínimas diferencias Significativas (LSD) entre las medias y test de rango múltiple (t de Student) para la comparación por separado de las fuentes de variación en los análisis multifactor.
- Análisis de la Varianza (ANOVA) multifactorial, siendo los días de recirculación para cada inoculante la variable independiente y los parámetros analizados en el efluente obtenido (nitrógeno total, nitrito, turbidez) la variable dependiente. Como covariable se empleó los días de funcionamiento. Igualmente se completó un Test de Mínimas diferencias Significativas (LSD) entre las medias y test de rango múltiple (t de Student) para la comparación por separado de las fuentes de variación en los análisis multifactor.

3ª y 4ª fases de la Investigación de choque. Estudios de formación de biopelícula.

- Análisis de la Varianza (ANOVA) de una vía, siendo el inoculante empleado la variable independiente y los parámetros analizados en el relleno (recuento de microorganismos, actividad desnitrificante) la variable dependiente. Igualmente se completó un Test de Mínimas diferencias Significativas (LSD) entre las medias y test de rango múltiple (t de Student) para la comparación por separado de las fuentes de variación en los análisis de una vía.

Para los estudios de funcionamiento de proceso:

- Análisis de la Varianza (ANOVA) multifactorial, siendo el inoculante empleado la variable independiente y los parámetros analizados en el efluente obtenido (nitrógeno total, nitrito, turbidez) la variable dependiente. Como covariable se empleó el tiempo de recirculación. Igualmente se

completó un Test de Mínimas diferencias Significativas (LSD) entre las medias y test de rango múltiple (t de Student) para la comparación por separado de las fuentes de variación en los análisis multifactor.

En la 4ª fase los análisis fueron análogos, cambiando el inoculante por mezclas de dos cepas diferentes. La comparativa se realizó con los resultados obtenidos para cada cepa como único inoculante.

Para la investigación de fondo se realizaron análisis de linealidad entre las características del efluente obtenido y las variables empleadas en la investigación (carga superficial y carga hidráulica)

Para estos tratamientos 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.

V.- INVESTIGACIÓN DE CHOQUE

V.- INVESTIGACIÓN DE CHOQUE

El origen de la biopelícula reside en la producción de un exopolisacárido por parte de una bacteria, el cual le permite adherirse a una superficie. A partir de esta unión inicial, los microorganismos pueden multiplicarse, dando lugar a este tipo de asociaciones biológicas. Sobre esta asociación inicial pueden adherirse otra serie de microorganismos tales como algas, protozoos, otras bacterias etc., que encuentran en ellas las necesidades fundamentales para su desarrollo, siendo las bacterias los microorganismos mayoritarios en la biopelícula.

La biopelícula formada sobre el material soporte es la responsable del tratamiento de agua subterránea mediante filtros sumergidos. La concentración de nutrientes y el tipo de éstos existentes en el medio condicionarán las propiedades estructurales de la biopelícula (tales como el espesor, la densidad o la porosidad) y el desarrollo de unos grupos fisiológicos de bacterias u otros (Lazarova and Manen, 1995):

- Si en el medio hay altas concentraciones de nutrientes, se podrá formar una biopelícula densa con un gran grosor y poca porosidad. Son estructuras de crecimiento muy rápido y con una fuerte estratificación, debido a la diferente disponibilidad de nutrientes en función de las capas. Este tipo de biopelícula es más frecuente si el medio acuoso de contacto es agua residual.
- Si el medio acuoso de contacto es pobre en nutrientes, la biopelícula será una estructura menos densa con poco espesor y muy canalizada (porosa). Esto es apreciable en superficies en contacto con aguas limpias como ríos, arroyos o incluso en las canalizaciones de agua de abastecimiento. Esta biopelícula es de crecimiento lento.

Otros factores que influirán también en la estructura de la biopelícula son los microorganismos que la forman (Sich and Van Rijn, 1997) y el soporte sobre el cual se desarrolla.

Así pues, en los sistemas de filtros sumergidos sin inoculación previa para tratamiento de aguas subterráneas contaminadas con nitrato se precisa de mayor tiempo para la formación de la biopelícula y presentan peores rendimientos que los sistemas inoculados, ya que el mayor número de microorganismos presentes en la biopelícula una vez formada corresponde a otro tipo de microorganismos no desnitrificantes (González-López, *et al*, 1999).

La aplicación de las condiciones idóneas mediante la inoculación previa del filtro biológico antes de la puesta en marcha ofrece una alternativa de tratamiento a las aguas subterráneas contaminadas con este anión. Mediante esta inoculación se busca potenciar el desarrollo de los microorganismos desnitrificantes presentes en la biopelícula, facilitando así su acción sobre el nitrato disuelto en el agua contaminada y evitar que la entrada en funcionamiento del sistema sea excesivamente lenta.

Para lograr esta inoculación, se precisan medios con una alta densidad bacteriana que permitan una rápida colonización del material soporte tras mantenerlo en contacto con éste. Por ello los principales inoculantes empleados para estos sistemas suelen ser licor mezcla procedente del reactor biológico de estaciones depuradoras o cultivos obtenidos a partir de suelos ricos en materia orgánica (Lazarova *et al*, 1992; Mohseni-Bandpi and Elliot, 1998), mediante los cuales se puede obtener de forma rápida una biopelícula efectiva. Los problemas principales que presentan este tipo de biopelículas es que son más heterogéneas y pueden desprender al agua tratada una mayor variedad de microorganismos entre los cuales pueden aparecer patógenos.

Según Hontoria, *et al* (1999), las biopelículas formadas con licor mezcla presentan un número de microorganismos muy elevado, existiendo un número semejante de bacterias desnitrificantes y reductores de nitrato y predominando otro tipo de microorganismos. Esto plantea problemas como es la pérdida de fuente de carbono por el consumo de microorganismos no desnitrificantes, que hace que el sistema sea menos eficaz, y por otro lado una mayor formación de nitrito que puede aparecer en concentración elevada en el agua tratada.

Si se realiza la identificación taxonómica de los microorganismos desnitrificantes aislados de la biopelícula obtenida a partir de licor mezcla (Gómez, *et*

al, 1999) se observa que se presentan cinco especies diferentes, siendo los géneros predominantes *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Agrobacterium*. Cada una de las especies aisladas presentan diferencias fisiológicas, por lo que no todas se adaptarán de igual modo a las características del proceso por sí solas (oxígeno disuelto, variación de pH, temperatura, nutrientes, etc.).

Cada una de las especies de bacterias desnitrificantes e incluso cada cepa pueden presentar diferente actividad desnitrificante, por lo que las variaciones en la composición de la biopelícula, debidas a cualquier tipo de cambio en el proceso, pueden afectarlo de forma negativa.

Dado que se busca minimizar el tiempo de puesta en marcha y aumentar la capacidad de eliminación de nitrato por parte de la biopelícula, descendiendo así los costes del proceso y el volumen de la instalación, para evitar los problemas que presentan las biopelículas formadas a partir de licor mezcla, se decidió dedicar esta investigación de choque al **estudio de la inoculación selectiva**: seleccionar un cultivo puro con alto potencial desnitrificante a partir de los microorganismos desnitrificantes aislados de la biopelícula formada con licor mezcla e inocular el sistema con dicho cultivo puro.

Mediante esta inoculación selectiva la biopelícula presentará una composición más homogénea, sobre todo en cuanto a desnitrificantes, y se podrá realizar un control más exhaustivo sobre la propia biopelícula y mejorar el rendimiento del proceso.

Todo este proceso precisaba una planta a escala de laboratorio de fácil manejo y control exhaustivo, empleando posteriormente los resultados obtenidos en instalaciones semi-técnicas para la determinación de parámetros de diseño y control.

V.1.- DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA PILOTO A ESCALA DE LABORATORIO

Como ya se ha indicado, estos ensayos se llevaron a cabo en **plantas a escala de laboratorio** (Figura V.1.) de forma que se facilitara la investigación, pues esta escala presenta diversas ventajas en el estudio de la inoculación selectiva:

- El cultivo a ensayar se puede manejar con facilidad, dado que por el tamaño de las plantas se requiere de un volumen pequeño para realizar la inoculación de las mismas.
- Posibilidad de esterilización de las plantas, de forma que se evite la contaminación del cultivo empleado y se puedan comparar los resultados obtenidos con las diferentes cepas seleccionadas para estudiar la inoculación selectiva.
- Se puede llevar un mejor control de la biopelícula formada, realizando mayor número de ensayos de la misma.
- Los datos que se obtienen a nivel del comportamiento microbiológico del sistema son más fiables permitiendo así su transferencia a escala semi-técnica.

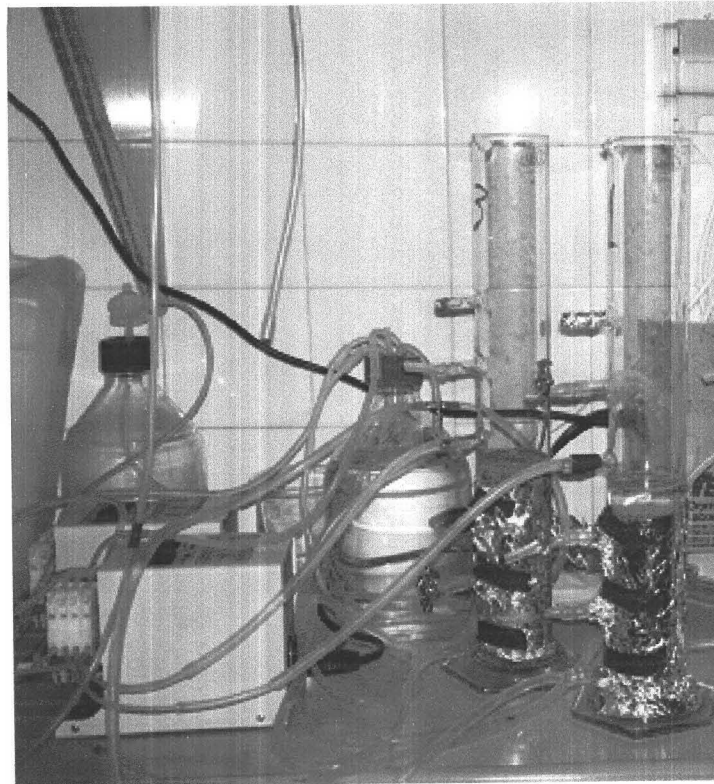


Figura V.1. Plantas a escala de laboratorio empleadas en la inoculación selectiva.

Las plantas a escala de laboratorio empleadas en esta fase de la investigación están basadas en el sistema de filtros sumergidos, sin ningún tipo de automatismo y con

gran simplicidad de funcionamiento. Consisten en un cilindro de 6 cm de diámetro, preparado a partir de una probeta de laboratorio de 1 litro de capacidad, que se rellena de material soporte hasta una altura de 15 cm. El material de relleno es de tipo cerámico (esquistos arcillosos) procedente de residuos de la construcción, con una granulometría entre 2 y 5 mm y una densidad relativa real de 2.06 g/cm^3 (Figura V.2).



Figura V.2. Relleno cerámico empleado en las plantas a escala de laboratorio.

La planta a escala de laboratorio consta de 6 puntos de entrada/salida dispuestos a lo largo del reactor para poder estudiar distintas posibilidades de entrada de agua y fuente de carbono y salida de agua tratada.

Dadas las pequeñas dimensiones de la planta y de los tubos de entrada/salida, el caudal de agua que se va filtrando va disminuyendo según se van colmatando el filtro y/o los tubos por la formación de biopelícula, produciéndose una elevación de la lámina de agua sobre el filtro. Puesto que se trata de un sistema simplificado para hacer unas pruebas de la inoculación selectiva del sistema no se dispuso mecanismo de lavado, por lo que para evitar problemas en los ensayos la duración máxima de cada uno fue de una semana, procediendo posteriormente al lavado de forma manual de las plantas y del relleno, así como a la esterilización antes de realizar el siguiente ensayo.

Las partes fundamentales de esta planta a escala de laboratorio fueron (Figura V.3.):

- Alimentación superior del agua a tratar.

El agua se disponía en un depósito de 25 l que se rellenaba manualmente con agua procedente del acuífero de la Vega de Granada cuyas características analíticas fueron: concentración de nitrato, 50-70 mg/l; concentración de nitrito, 0.0-0.01 mg/l; concentración de fosfato, 0.4-0.8 mg/l; concentración de sulfato, 180-210 mg/l; oxígeno disuelto, 2.0-4.5 mg/l y pH 7.0-7.5.

Una vez el agua en el depósito se aumentó la concentración de NO_3^- a 100 mg/l. Esta concentración se eligió porque era la que se presentaba mayoritariamente en los acuíferos de muchas áreas rurales de España (Anon, 1995). No se eliminó el oxígeno disuelto, al encontrarse éste en baja concentración.

- Alimentación superior de la fuente de carbono.

Dado el escaso caudal que se necesitaba para la fuente de carbono, se decidió introducir ésta por otro punto de entrada diferente del anterior, evitando así retrocesos en el flujo de la fuente de carbono que impedían su entrada a la planta si éste se unía con el de entrada de agua a tratar, caudal unas 5 veces superior al necesario para la fuente de carbono. La relación C/N necesaria en el influente para eliminar completamente los 100 mg/l de nitrato varía según la fuente de carbono; siguiendo las indicaciones de Gómez, *et al*, (2000) la fuente de carbono que se dosificó era etanol en cantidad suficiente para obtener una relación C/N=1.08.

- Bomba peristáltica de 4 vías, tanto para la entrada de agua como de fuente de carbono. Para la regulación de caudales de ambas entradas se empleaban tubos de diferente grosor, así como la regulación de la propia bomba.
- Salida del agua tratada.

Por la parte inferior de la planta se colocó la salida del agua tratada poniendo el tubo de salida en forma de sifón para que el filtro funcionase sumergido.

El sistema se inoculó con un cultivo bacteriano de alta densidad, el cual una vez preparado se recirculó a través del filtro con la idea de formar la biopelícula bacteriana responsable del proceso de desnitrificación, necesitándose un volumen de 2 litros de dicho cultivo para poder mantenerlo en recirculación.

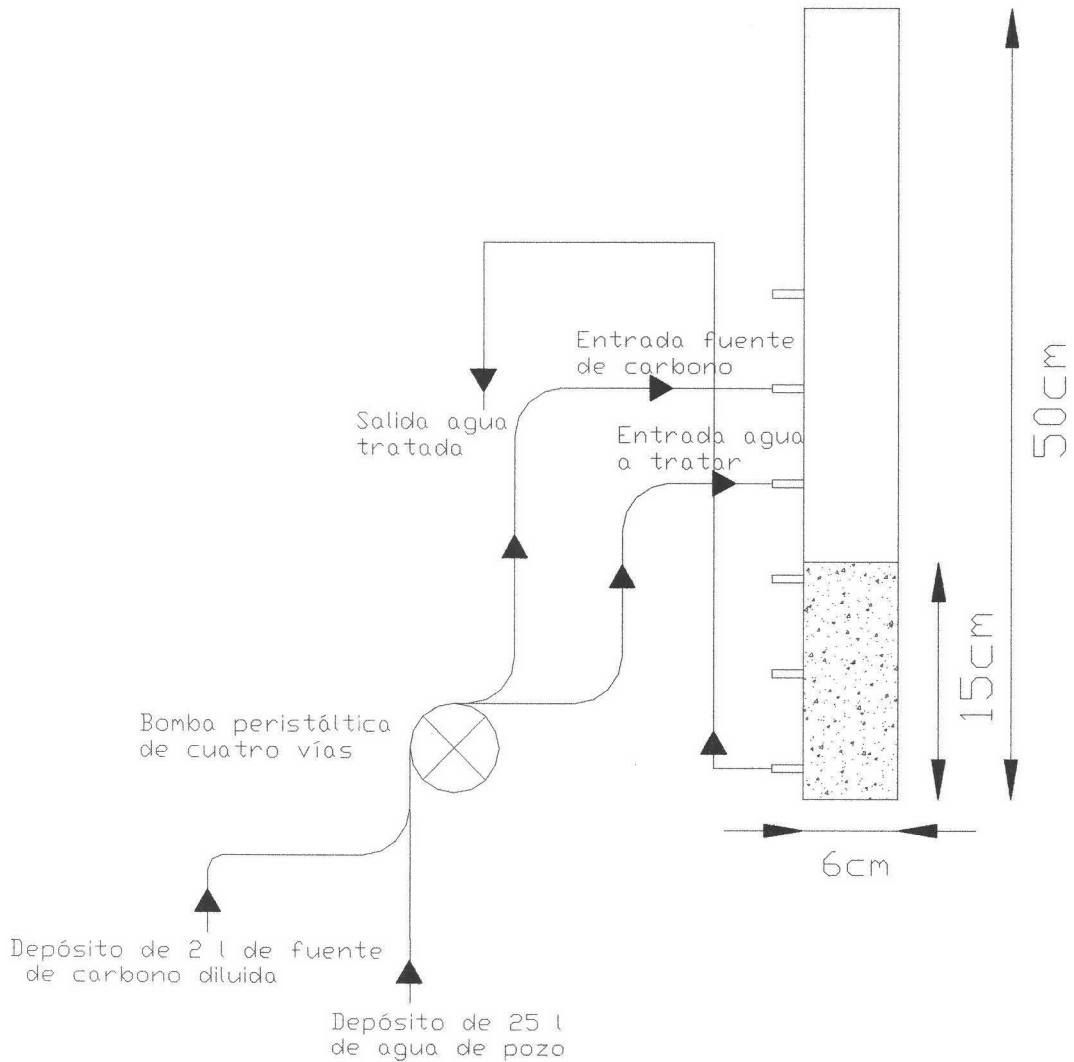


Figura V.3. Esquema del funcionamiento de la planta

V.2.- PLAN DE TRABAJO

Para realizar el estudio de la inoculación selectiva la investigación se dividió en cuatro fases de trabajo:

- En una **primera fase** se decidió emplear una cepa con alta actividad desnitrificante (*Ps. mendocina*) aislada de una biopelícula formada empleando como inoculante licor mezcla procedente de un reactor de fangos activos, con una carga hidráulica de $9 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$. Dado que en estas condiciones no se formó prácticamente biopelícula sobre el material soporte empleado, se decidió reducir el caudal de trabajo, ensayar mayores tiempos de recirculación del inóculo y estudiar diferentes rellenos cerámicos comprobando sus características. Así pues, se repitieron las pruebas de la inoculación selectiva anteriores pero con una carga hidráulica de $3 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$, aumentando el tiempo de recirculación y empleando un nuevo material soporte.
- La **segunda fase** se inició al no alcanzarse rendimientos óptimos en las condiciones de trabajo anteriores. Se decidió continuar con el estudio de la inoculación selectiva pero modificando nuevamente las condiciones de trabajo y empleando diferentes inoculantes (licor mezcla, *Ps. mendocina* y *Ag. radiobacter*) para comprobar ventajas y desventajas de unos y otros en la fase de inoculación. De igual forma se estudiaron diferentes tiempos de recirculación (1, 3, 5 y 9 días), tratando de estudiar su influencia en la formación de una biopelícula estable.
- La **tercera fase** de la investigación surgió al comprobar que la inoculación selectiva presentaba ventajas frente a la inoculación realizada con cultivo heterogéneo de alta carga bacteriana (licor mezcla), siendo necesario únicamente 1 día de recirculación para formación de la biopelícula. Así pues, se decidió continuar la investigación de la inoculación selectiva estudiando nuevas cepas seleccionadas por su actividad desnitrificante y su capacidad para desarrollar biopelículas.
- Por último, la **cuarta fase** se decidió para estudiar la inoculación mezclando cepas estudiadas en la fase anterior, de forma que se aprovechara la alta actividad desnitrificante manifestada por unas cepas y la capacidad de adherencia manifestada por otras.

En todas las fases de la investigación, los datos se tomaron entre 15 y 20 °C, despreciándose los datos analizados fuera de ese rango de temperaturas.

V.3.- 1ª FASE DE LA INVESTIGACIÓN A ESCALA DE LABORATORIO

El objetivo de esta fase de la investigación fue estudiar la posibilidad de emplear la inoculación selectiva para la formación de la biopelícula responsable del proceso de desnitrificación, buscando tanto minimizar el tiempo de puesta en marcha del sistema como aumentar la capacidad de eliminación de nitrato por parte de la biopelícula. Según Gómez, *et al*, (1999) mediante esta inoculación selectiva la biopelícula presentará una composición más homogénea, sobre todo en cuanto a desnitrificantes, y se podrá realizar un control más exhaustivo sobre la propia biopelícula, así como mejorar el rendimiento del proceso.

Para dicho estudio se empleó una cepa aislada con actividad desnitrificante alta, *Pseudomonas mendocina*, procedente de una biopelícula formada empleando como inoculante licor mezcla. Este microorganismo, el cual se presentaba mayoritario en la biopelícula, crece con facilidad en medios de cultivo definidos, no afectando la presencia de oxígeno disuelto en la fase de crecimiento al desarrollar posteriormente la actividad desnitrificante (el oxígeno no afecta a la formación del equipo enzimático desnitrificante).

El medio de cultivo empleado para el crecimiento del microorganismo inoculante fue semejante al influente a tratar, de forma que las bacterias en su crecimiento se fuesen adaptando a los nutrientes que contenía el agua a tratar posteriormente, no suponiendo un cambio importante las condiciones de trabajo posteriores con las condiciones de crecimiento de la cepa. Así pues, se empleó agua de pozo descarbonatada (el carbonato se eliminó por precipitación a 120 °C), para evitar precipitados que provocasen turbidez que falseara los datos y oclusiones en el sistema, y con una relación C/N=1, obtenida empleando etanol como fuente de carbono en una relación etanol/nitrato = 0,43. Al agua se le adicionaron sales como reguladoras de pH (K_2HPO_4) y sales como fuente de nutrientes para la cepa ($FeSO_4 \times 7H_2O$, fuente de hierro; $MgSO_4 \times 7H_2O$, fuente de azufre y magnesio; KCl, fuente de cloro y de potasio).

El caudal de trabajo seleccionado inicialmente en la investigación fue de 25 l/d, obteniéndose así una carga hidráulica de $9 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$, siguiendo las indicaciones de González- López, *et al* (2000).

V.3.1.- Variables y parámetros de la 1ª fase de la investigación de choque.

La **VARIABLE** inicial que se controló en el proceso fue:

- **Tiempo de recirculación** necesario para la formación de la biopelícula, empleando como inoculante el cultivo puro formado en el medio de cultivo indicado anteriormente y con la cepa *Pseudomonas mendocina*. Se ensayó con dos tiempos de recirculación: 12 horas y 24 horas. Se pretendía así conocer la influencia de esta variable en el desarrollo de la biopelícula sobre el soporte.

Los **PARÁMETROS** que se controlaron en el proceso fueron los siguientes:

- **Sobre el relleno**, tomando muestras una vez finalizada la recirculación y tras 12 horas de puesta en marcha, se analizaron:
 - a) Recuento de microorganismos, proteínas y peso seco, parámetros que nos asesoraron sobre la capacidad de colonización del relleno por parte de la cepa, comparando así la biopelícula formada en los diferentes tiempos.
 - b) Microscopía de barrido de superficie, donde se podía ver la formación de la biopelícula para los diferentes tiempos de recirculación confirmando la colonización del relleno.
 - c) Actividad desnitrificante de la cepa. Este parámetro asesoraba sobre la capacidad potencial de eliminar nitrato del sistema.
- **Sobre el agua tratada**. Tomando muestras de agua tras 12 horas de puesta en marcha, se analizaron:
 - a) Concentración de nitrato y nitrito para comprobar el rendimiento de la planta en eliminación de nitrógeno.
 - b) Turbidez y recuento de microorganismos. Ambos parámetros nos daban idea del posible desprendimiento de la biopelícula del relleno y de la necesidad de tratamientos posteriores del agua desnitrificada.

V.3.2.- Resultados previos de la 1ª fase

Los resultados obtenidos en los análisis realizados sobre las muestras de relleno se indican en las siguientes gráficas (Fig. V.4., V.5. y V.6.):

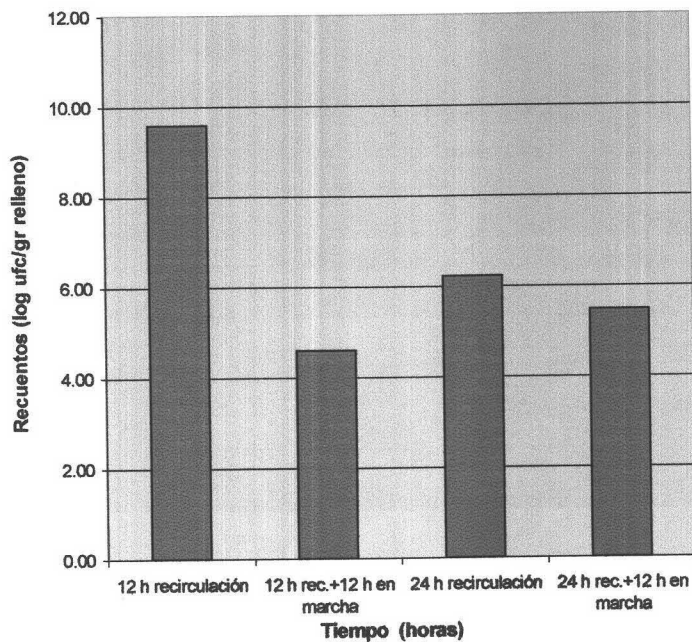


Fig. V.4. Recuentos de *Pseudomonas mendocina* en el relleno tras la recirculación y tras 12 horas de funcionamiento.

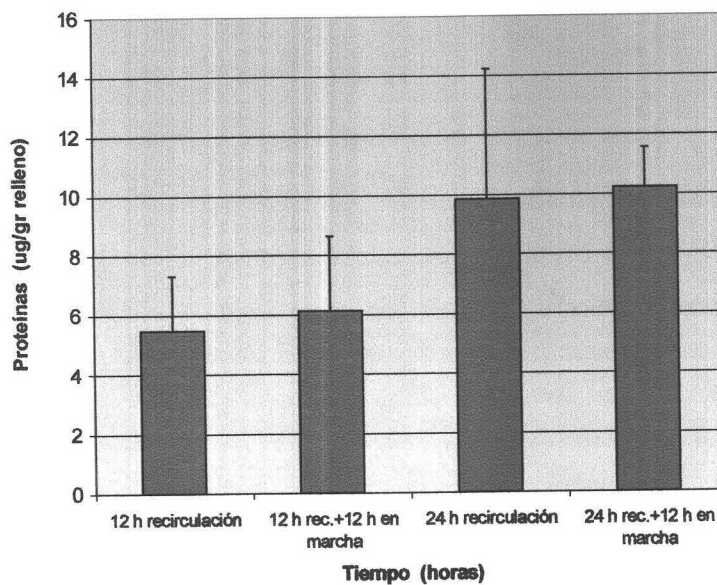


Fig.V.5. Proteínas en el soporte tras la recirculación con cultivo de *Pseudomonas mendocina* y tras 12 horas de funcionamiento.

(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

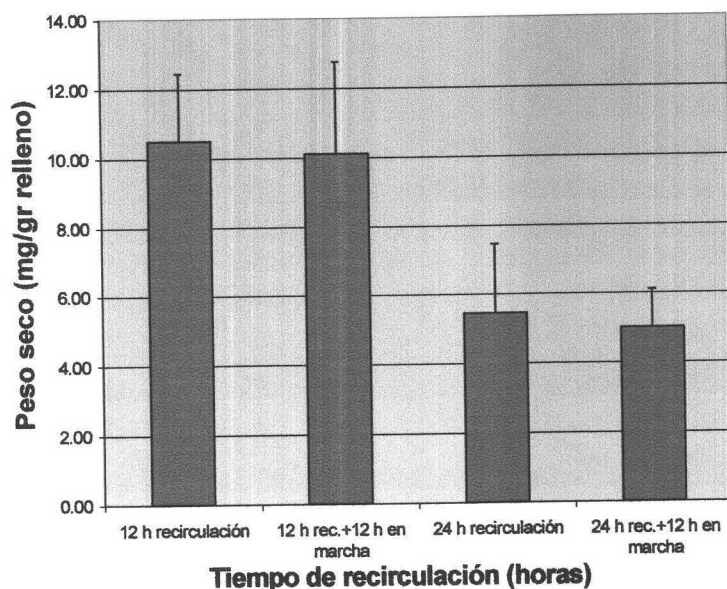


Fig. V.6. Peso seco en el relleno tras la recirculación con cultivo de *Pseudomonas mendocina* y tras 12 horas de funcionamiento.

(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

El recuento de microorganismos en la biopelícula disminuyó al aumentar el tiempo de recirculación y tras doce horas de la puesta en marcha de la planta (Fig. V.4.), es decir, la cepa *Pseudomonas mendocina* tuvo un crecimiento rápido pero no se pudo decir lo mismo de su permanencia. El parámetro peso seco (Fig. V.6.) también fue menor tras la puesta en marcha del sistema, mientras que las proteínas (Fig. V.5.) aumentaron con el tiempo de recirculación y levemente con el tiempo de puesta en marcha. No se detectó actividad desnitrificante en las muestras de relleno analizadas.

Los resultados obtenidos en el análisis del agua a la salida de la planta una vez finalizada la recirculación y tras doce horas de puesta en marcha, fueron los siguientes (Fig. V.7. y V.8.):

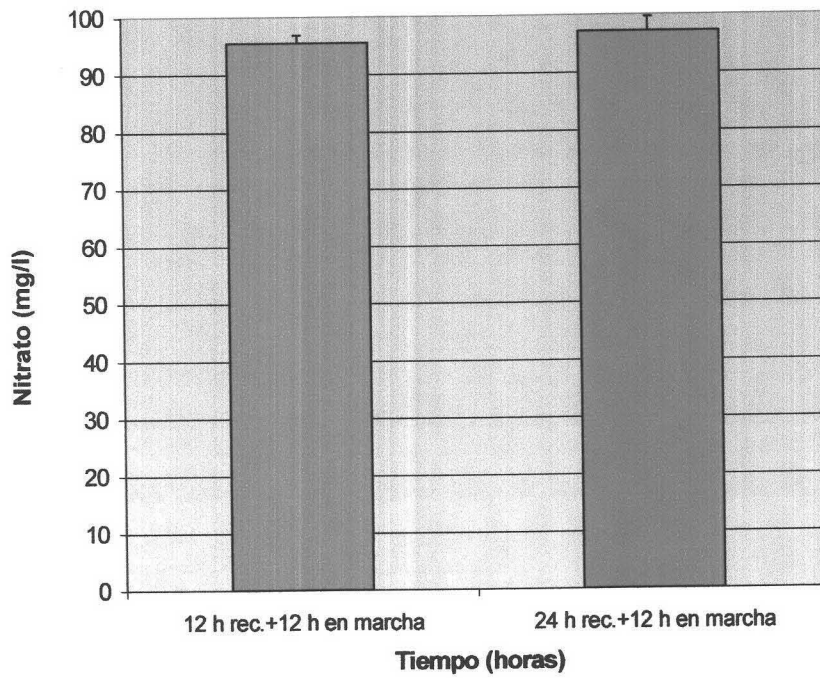


Fig.V.7. Concentración de nitrato en agua de salida empleando *Pseudomonas mendocina* como inoculante

(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

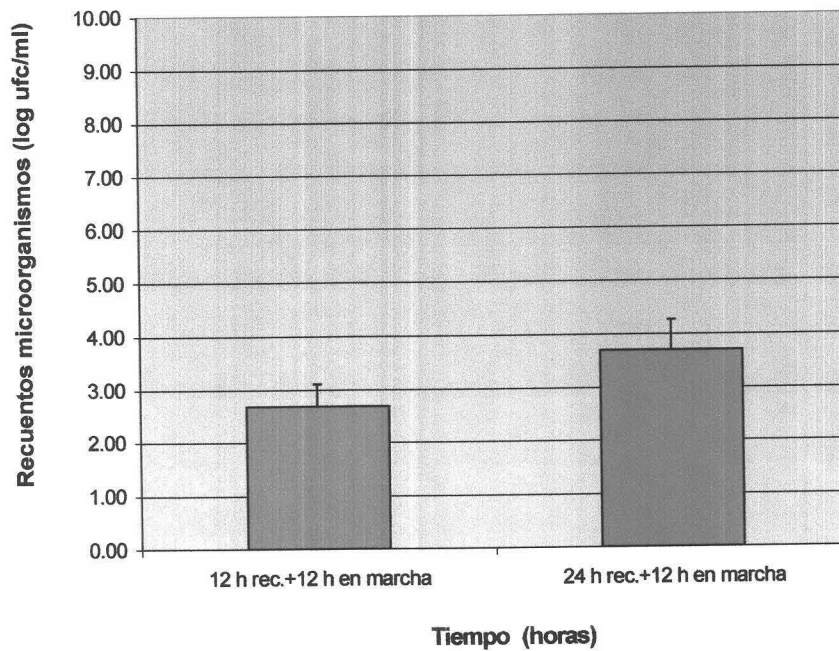


Fig.V.8. Recuentos microorganismos en agua de salida empleando *Pseudomonas mendocina* como inoculante

(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

El nitrato eliminado tras 12 horas de puesta en marcha, una vez finalizados los dos tiempos de recirculación ensayados, fue inferior al 5% en ambos casos, no detectándose prácticamente nitrito en la salida (0.12 mg/l como máximo). Este casi nulo rendimiento coincidió con la total ausencia de la actividad desnitrificante de la biopelícula. Si se observa el número de microorganismos en el agua de salida, puede comprobarse como aumentan con el tiempo de recirculación de la planta. De igual forma, el recuento de microorganismos en el relleno descendió tras las 12 horas de puesta en marcha de la planta, lo que lleva a pensar que el problema fundamental en el mal funcionamiento del sistema venga motivado por problemas de adherencia de los microorganismos en el relleno empleado.

Observando mediante microscopía de barrido de superficie una muestra de relleno tras 24 horas de recirculación (Fig. V.9.), puede apreciarse como no se formó prácticamente biopelícula sobre el material soporte empleado. Tan solo se pueden observar algunos microorganismos adheridos sobre el relleno, lo cual justificaría la nula actividad desnitrificante cuyo valor no sería detectable mediante la técnica cromatográfica empleada.

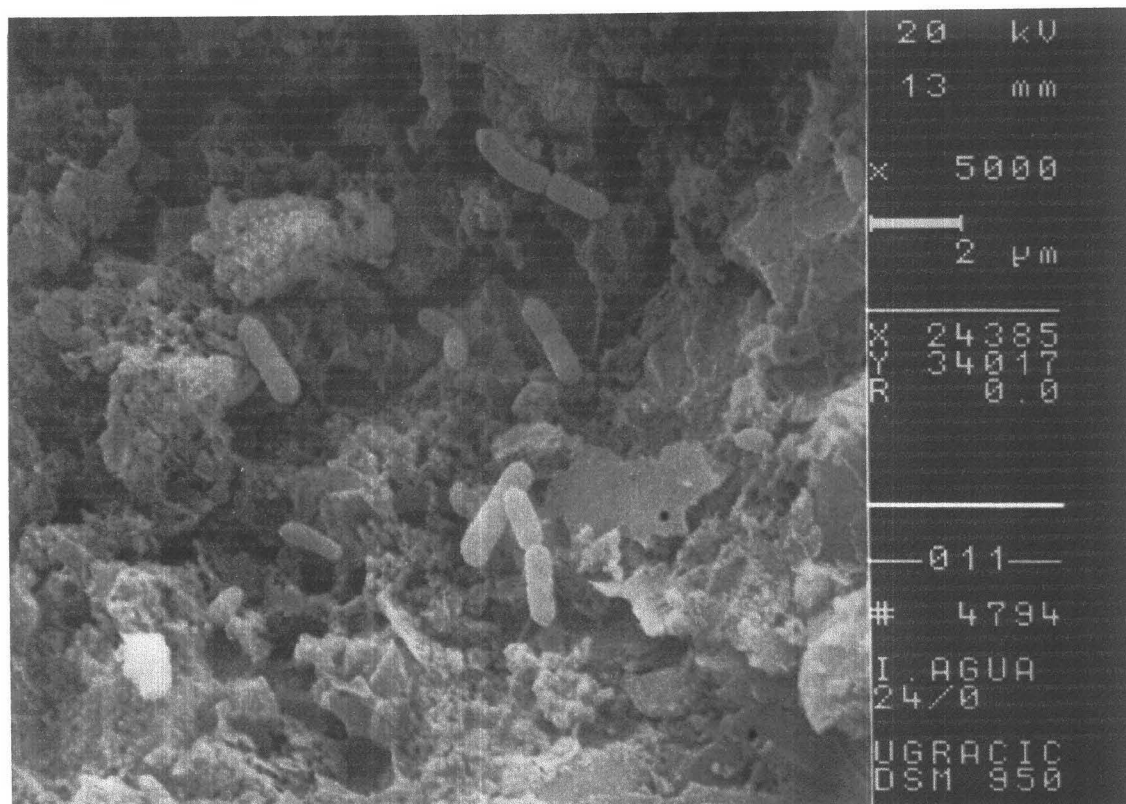


Fig V.9. Muestra de relleno tras 24 horas de recirculación, empleando *Pseudomonas mendocina* como inoculante.

A la vista de los resultados obtenidos, se decidió **reducir el caudal de trabajo** para comprobar si el caudal anterior realizaba arrastre de la biopelícula en la fase de formación y **ensayar mayores tiempos de recirculación** para conseguir biopelículas más estables.

Por los resultados obtenidos en el análisis del peso seco se pudo apreciar que el relleno empleado daba problemas de disgregación, lo cual falseaba los datos de peso seco no existiendo correlación entre éste y el número de microorganismos presentes. Por ello, previo a la continuación de los ensayos **se estudiaron las características de diferentes rellenos cerámicos**, tratando de evitar la disgregación.

En el proceso de fabricación y colocación en obras de construcción se obtiene dos tipos de residuo cerámico que es importante diferenciar:

- Residuo cerámico obtenido del rechazo por su inadecuada calidad de fabricación.
- Residuo cerámico obtenido del rechazo por roturas por deficiente manipulación bien en fábrica o en obra.

El relleno cerámico que se estaba empleando en la investigación era el procedente del machaqueo del reciclado de una fábrica de materiales cerámicos, ubicada en Jun (provincia de Granada); para transformar este ladrillo de desecho en relleno cerámico de un lecho inundado, es necesario realizar una serie de operaciones además del machaqueo que se lleva a cabo en la fábrica:

- Es necesario realizar un lavado del relleno para eliminar todas las impurezas que pueda traer y los finos que nos puedan colmatar rápidamente el filtro.
- Por último, realizar un tamizado para escoger una granulometría determinada. Se ensayó con la granulometría entre 2 y 5 mm para tener mayor superficie específica.

Otro aspecto importante que se obtuvo como conclusión del tiempo de investigación transcurrido es la procedencia de este relleno, ya que como se ha dicho anteriormente existen dos rellenos diferentes según su procedencia; inicialmente se empleaba este relleno obtenido del machaqueo del reciclado de la fábrica sin importar el motivo de su rechazo, detectándose una serie de problemas, ya que el **carácter estructural del residuo cerámico es muy importante para la función de soporte de biopelícula**. Esto se pudo observar mediante la microscopía electrónica de barrido de superficie realizada a distintos rellenos utilizados y en diferentes condiciones, donde se observó la superficie del relleno y la biopelícula adherida:

· Si el residuo procede del rechazo de una cocción elevada (Fig. V.10.) se obtiene una superficie excesivamente lisa, debido al grado de vitrificación alcanzado, con bajo porcentaje en poros, por lo que es muy difícil que se adhiera la biopelícula.

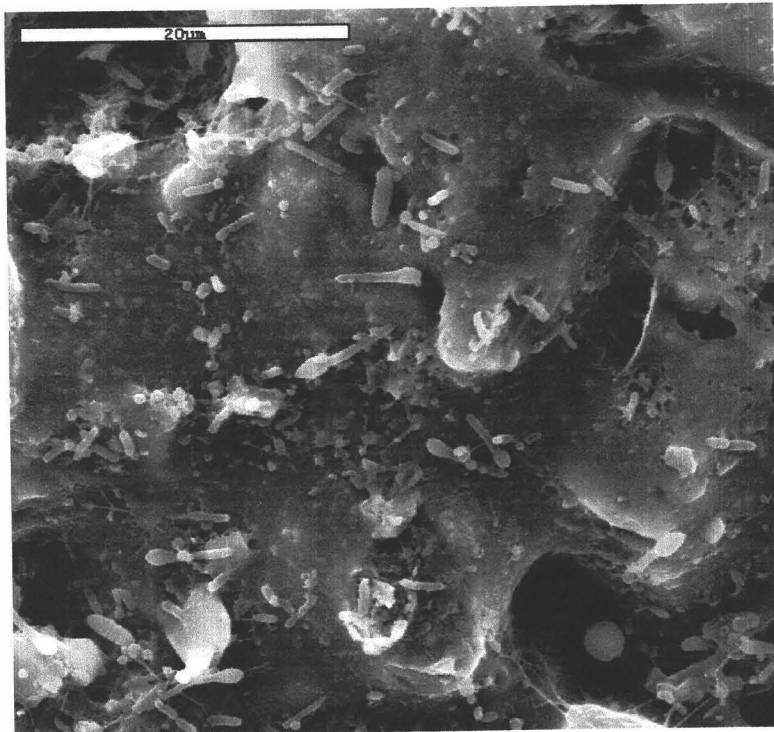


Figura V.10. Biopelícula formada sobre residuo con una cocción elevada.

Así pues, este tipo de residuos presentan una serie de problemas:

- Es más difícil la adherencia de ciertos microorganismos, por lo que en función del tipo de bacteria que se pretende forme la biopelícula se tendrán problemas más o menos serios:
 - * Si se trata de agua residual el problema de adherencia es mínimo, ya que aparece una amplia gama de microorganismos dentro de los cuales se encuentran muchas bacterias con alta capacidad de producción de EPS, es decir, alta capacidad de adherencia.
 - * Por el contrario, para procesos de inoculación selectiva este problema puede dar lugar a una mala fijación de biopelícula, por lo que el rendimiento del proceso será menor.
- En cualquier caso hay que tener en cuenta que la vitrificación del ladrillo da lugar a una pérdida de porosidad, por lo que se reduce considerablemente la superficie específica.
- Esta baja porosidad hace que la biopelícula formada sea sólo exterior, por lo que los problemas de atascos son más serios y frecuentes y los lavados de la biopelícula por la acción del flujo del agua mayores.

·Si el residuo procede del rechazo de una baja cocción al colocarlo como relleno en un lecho inundado y funcionar como filtro bien de agua residual o agua subterránea se irá deshaciendo con el paso del tiempo, lo que se traduce en disminución de la superficie específica y en una más rápida colmatación del filtro; al realizar los lavados de la planta este problema se agudiza enormemente como pudo apreciarse en el resultado del ensayo de sedimentación del agua de salida de un filtro tras realizarle el lavado con aire y agua, sin previa formación de biopelícula (Fig. V.11.).



Figura V.11. Ensayo de sedimentación del agua de salida de la planta tras realizar el lavado, sin previa formación de biopelícula.

Los problemas principales que provocan este tipo de rellenos son los siguientes:

- Desprendimiento del residuo cerámico formando un barro que puede dar problemas de oclusión de difusores tanto de aire como de agua, así como del propio lecho.
- Pérdida de material, sobre todo de las capas exteriores donde la biopelícula está adherida, por lo que el rendimiento desciende.
- Peores características del agua tratada al contar con un incremento en sólidos, sobre todo del agua procedente del lavado donde el problema es más acusado.
- La pérdida del material indicada anteriormente obligará a realizar una reposición del mismo debido a que irá disminuyendo la superficie específica.

· Si el *residuo procede del rechazo por roturas por deficiente manipulación, pero ha recibido una cocción correcta* o un poco excesiva, presenta una adecuada porosidad para la adherencia de la biopelícula. Así pues, en este tipo de residuos la superficie específica y la adherencia son mayores, por lo que aumenta la biopelícula formada. Todo esto se traduce en un aumento del rendimiento de los procesos sin aumentar la necesidad de lavados, ya que la biopelícula formada es principalmente interior, como puede apreciarse en la siguiente foto (Fig.V.12.).

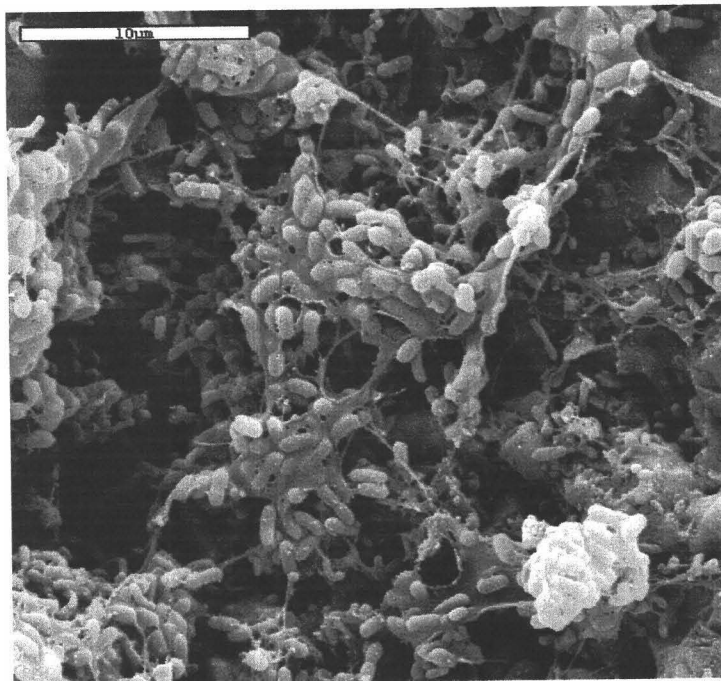


Figura V.12. Biopelícula formada sobre residuo procedente de rechazo por rotura.

A la vista de esta investigación, se realizó una prueba de ultrasonidos al residuo cerámico empleado en la investigación, del cual no se conocía exactamente su procedencia, y a un residuo cerámico sometido a un leve tratamiento térmico para mejorar sus propiedades. Los sólidos en suspensión para el primer residuo eran de 78.95 mg/l/gr relleno, y los sólidos totales 121.15 mg/l/gr relleno, mientras que para el segundo eran 58.92 y 37.52 mg/l/gr relleno, respectivamente. Por tanto, otro de los problemas del mal funcionamiento del sistema se comprobó que venía motivado por el tipo de residuo empleado, ya que este desprendimiento importante del material provoca también el desprendimiento de la biopelícula disminuyendo el rendimiento del sistema con el tiempo de funcionamiento del sistema.

Tras estos ensayos se **decidió seleccionar el material soporte empleado en la investigación utilizando únicamente el procedente de rechazo por rotura**, material que posteriormente se machaca, se lava y se tamiza en las condiciones deseadas (granulometría entre 2 y 5 mm). Se decidió eliminar el parámetro de peso seco, pues no era representativo de la biopelícula formada sobre el soporte debido al desprendimiento que se produce del material cerámico, y el parámetro de proteínas, dado que se observó que no había linealidad entre la concentración de éstas y la intensidad de color manifestada en la reacción con el reactivo de Bradford empleado. Esto es debido a la reacción de dicho reactivo con los restos cerámicos desprendidos del relleno, tal y como se demostró para un ensayo en blanco sin formación previa de biopelícula.

Tras todas las conclusiones obtenidas se repitieron las pruebas realizadas anteriormente pero disminuyendo el caudal de trabajo a 8.76 l/d, es decir con una **carga hidráulica de $3 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$** , empleando un **nuevo material soporte (Fig.V.13.)**, y **aumentando el tiempo de recirculación** para formación de la biopelícula.



Figura V.13.: Nuevo material soporte empleado en la investigación, procedente del rechazo por rotura, una vez machado, lavado y tamizado.

Los resultados obtenidos, tomadas muestras de relleno tras 24, 48 y 72 horas de recirculación y tras 24 horas de funcionamiento finalizadas las respectivas recirculaciones, fueron los siguientes:

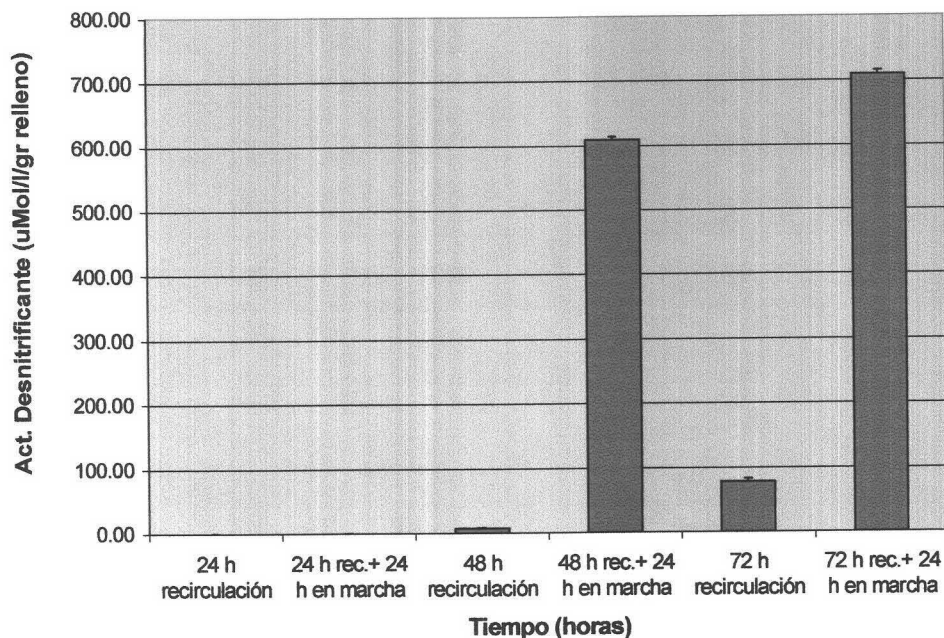


Fig. V.14. Actividad Desnitrificante empleando cultivo de *Ps. mendocina* y un nuevo material soporte procedente del rechazo por rotura.

(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Como puede comprobarse, la actividad desnitrificante aumentó al incrementar el tiempo de recirculación, creciendo ésta significativamente tras la puesta en marcha del sistema durante 24 horas.

Los resultados de los análisis realizados en el agua de salida tras 24 horas de funcionamiento para cada una de las recirculaciones ensayadas se muestran en las figuras V.15. y V.16.

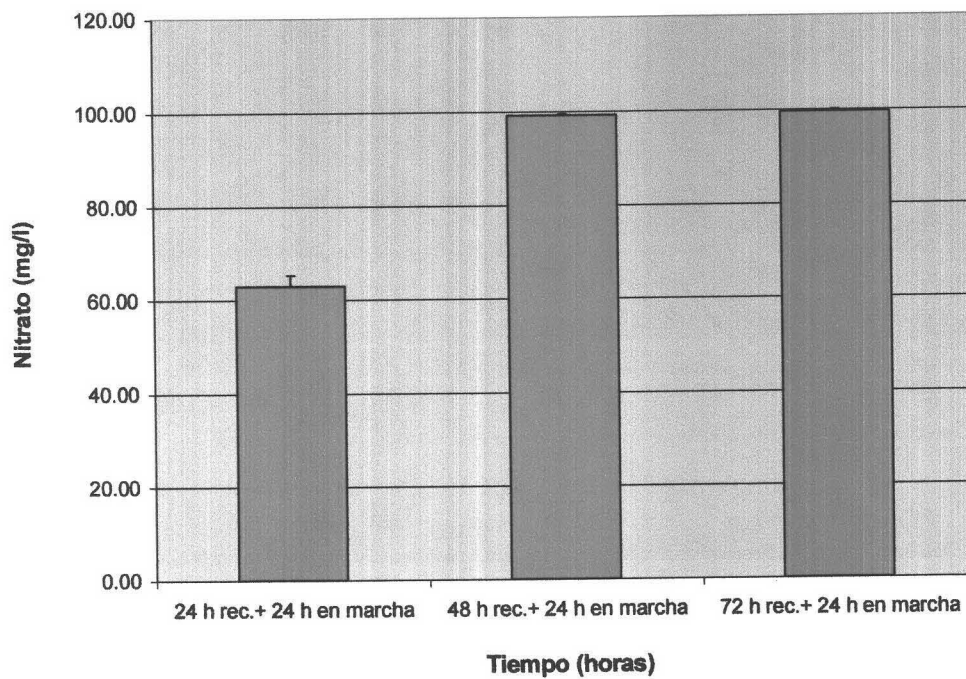


Fig.V.15. Concentración de nitrato en el agua tratada empleando cultivo de *Ps. mendocina* y un material soporte procedente del rechazo por rotura.

(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

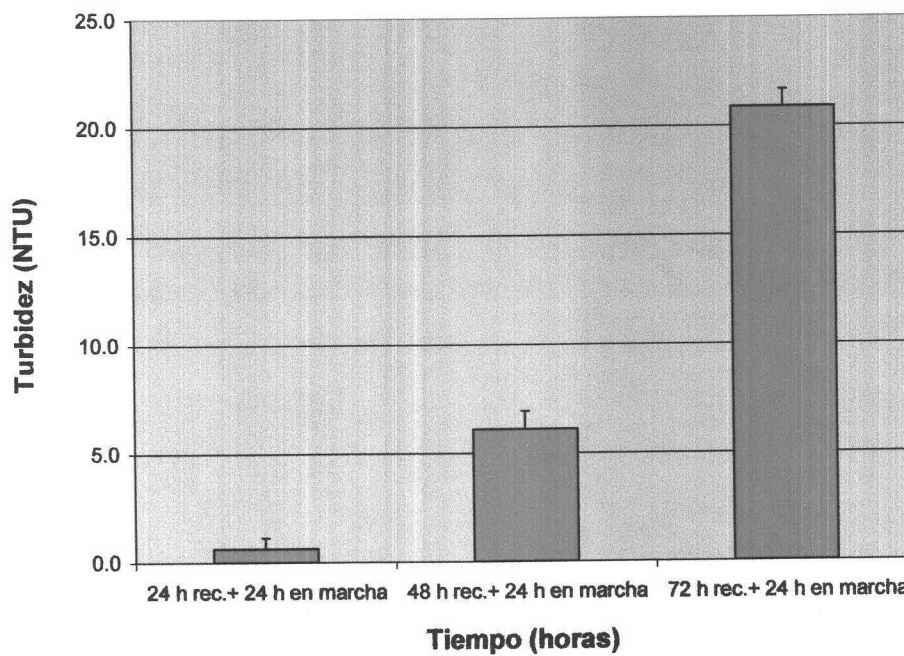


Fig.V.16. Turbidez agua de salida empleando cultivo de *Ps. mendocina* y un material soporte procedente del rechazo por rotura.

(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

A pesar de que la biopelícula tenía actividad desnitrificante, ésta no fue efectiva, pues el rendimiento en eliminación de nitrato fue muy bajo, no detectándose prácticamente nitrito en ninguno de los ensayos. La turbidez en el agua de salida incrementaba al aumentar el tiempo de recirculación, lo cual es indicativo de que se producían desprendimientos de la biopelícula. Estos desprendimientos venían a poner de manifiesto la poca estabilidad de la biopelícula, la cual a pesar de desarrollar alta actividad era arrastrada por el flujo del agua no apreciándose rendimientos en el sistema.

Para poder observar si se formaba biopelícula en los ensayos realizados, se estudiaron las muestras de relleno mediante microscopía de barrido de superficie apreciándose que en ninguno de los tiempos de recirculación ensayados se colonizaba el material soporte mediante los microorganismos inoculados.

En las fotografías obtenidas a partir de la microscopía de barrido de superficie realizadas al relleno tras 24 horas de recirculación y tras 24 horas en funcionamiento una vez finalizada la recirculación (Figuras V.17.y V.18., respectivamente) no se apreciaba biopelícula formada , aunque sí había algunas cepas adheridas de forma aislada. Como puede apreciarse en la figura V.18., el número de microorganismos incrementó tras el funcionamiento del sistema destacando algunas cepas con morfología en espiral típicas de aguas limpias. Esto puso de manifiesto la colonización del relleno por microorganismos presentes en el influente.

En las muestras de relleno tras 48 horas de recirculación tampoco se observaba biopelícula, únicamente pequeñas unidades bacterianas aisladas (Figura V.19.). Nuevamente, tras las 24 horas de funcionamiento el número de microorganismos incrementó debido a la presencia de cepas con formas coccas, típicas de aguas limpias (Figura V.20.).

En la muestra de relleno obtenida tras 72 horas de recirculación tampoco se apreciaba la formación de biopelícula (Fig. V.21.). En la única muestra donde se apreció mayor colonización, sin llegar a constituir biopelícula fue tras 72 h de recirculación y 24 h en funcionamiento (Fig. V.22.). Esto pone de manifiesto la importancia que puede tener el tiempo de recirculación en esta cepa para la formación de biopelículas estables.

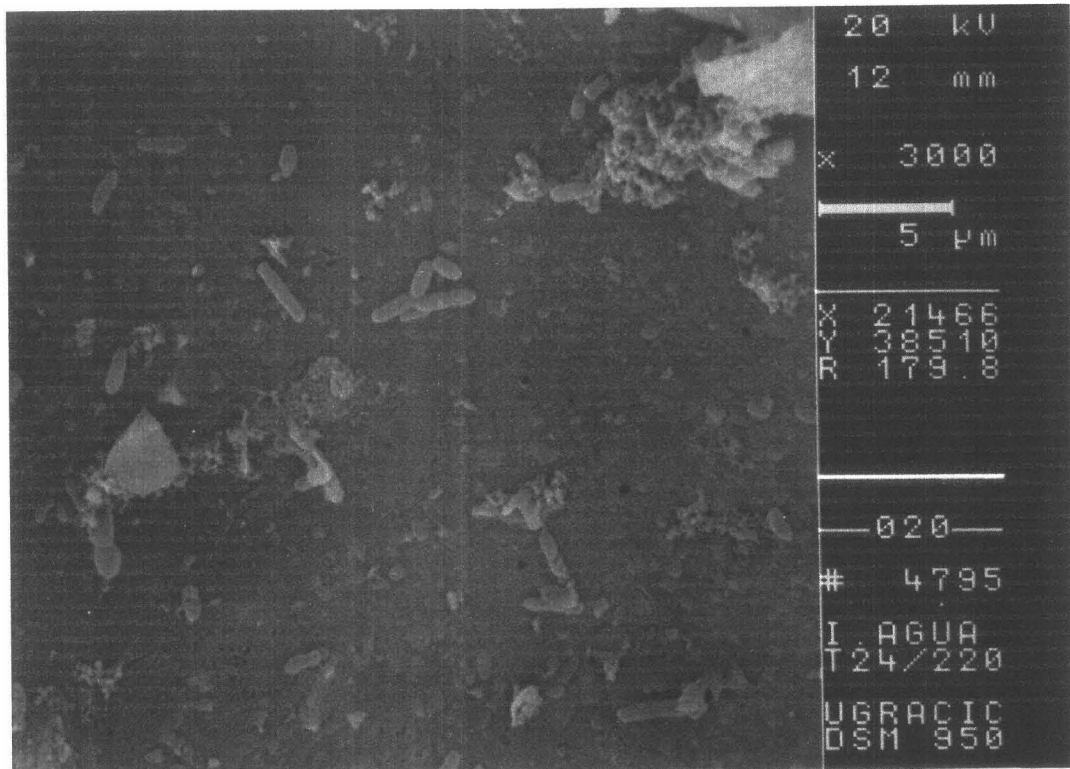


Fig V.17. Muestra de relleno tras 24 horas de recirculación, empleando cultivo de *Ps. mendocina* y un nuevo material soporte procedente del rechazo por rotura.

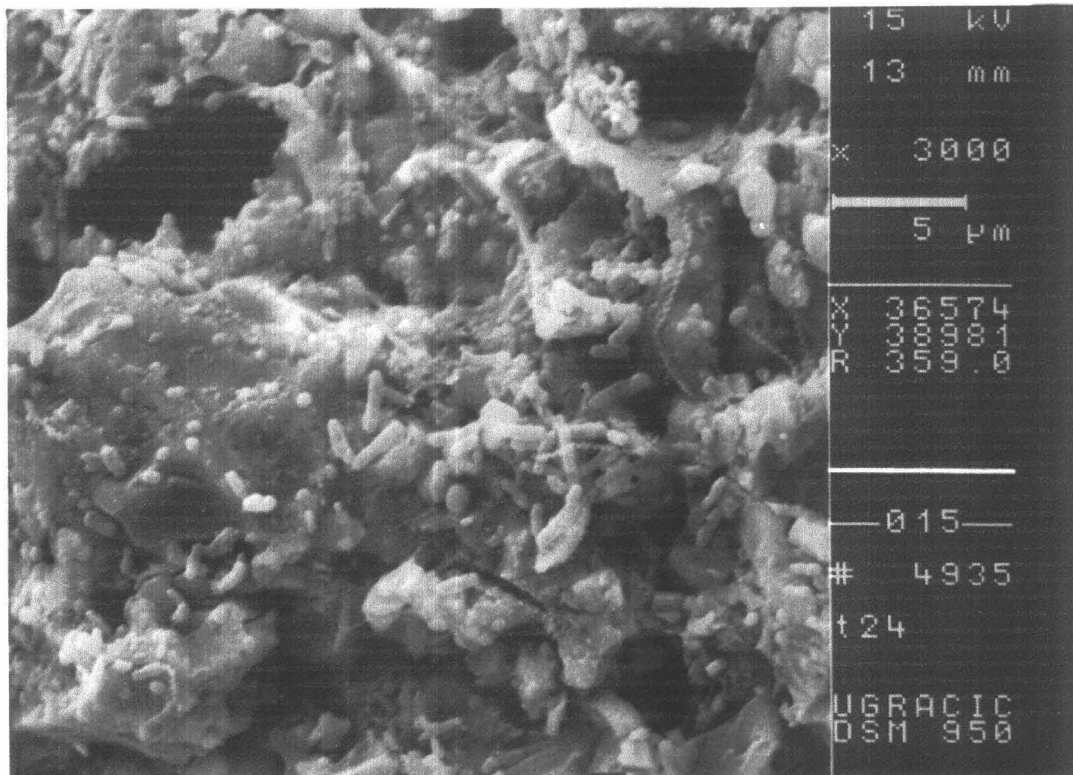


Fig V.18. Muestra de relleno tras 24 h de recirculación y 24 h de funcionamiento, empleando cultivo de *Ps. mendocina* y un nuevo material soporte procedente del rechazo por rotura.

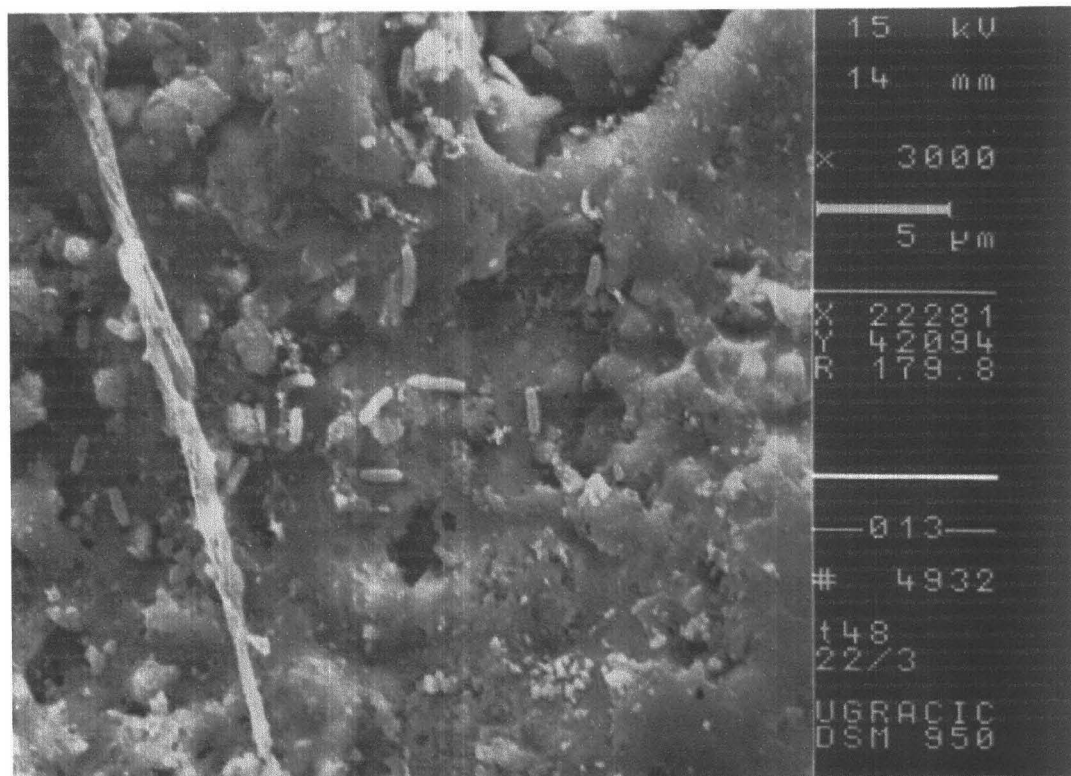


Fig V.19. Muestra de relleno tras 48 horas de recirculación, empleando cultivo de *Ps. mendocina* y un nuevo material soporte procedente del rechazo por rotura.

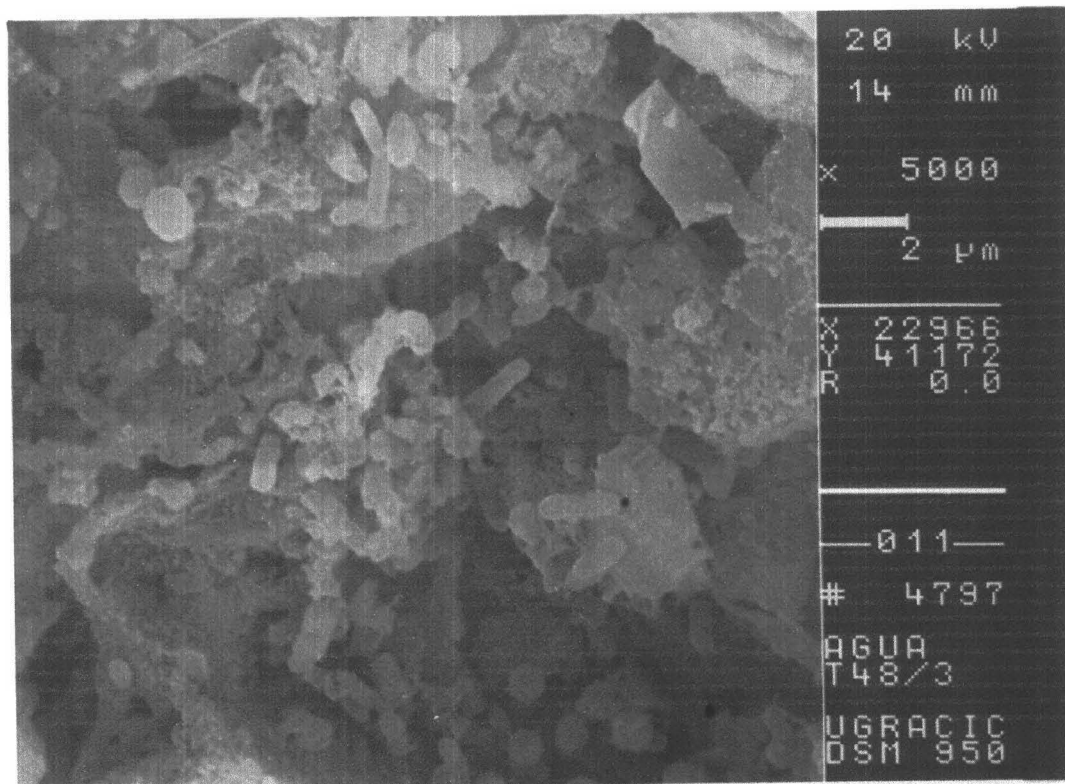


Fig V.20. Muestra de relleno tras 48 horas de recirculación y 24 horas de funcionamiento, empleando cultivo de *Ps. mendocina* y un nuevo material soporte procedente del rechazo por rotura. (Foto a mayor aumento para apreciar la colonización del sistema).

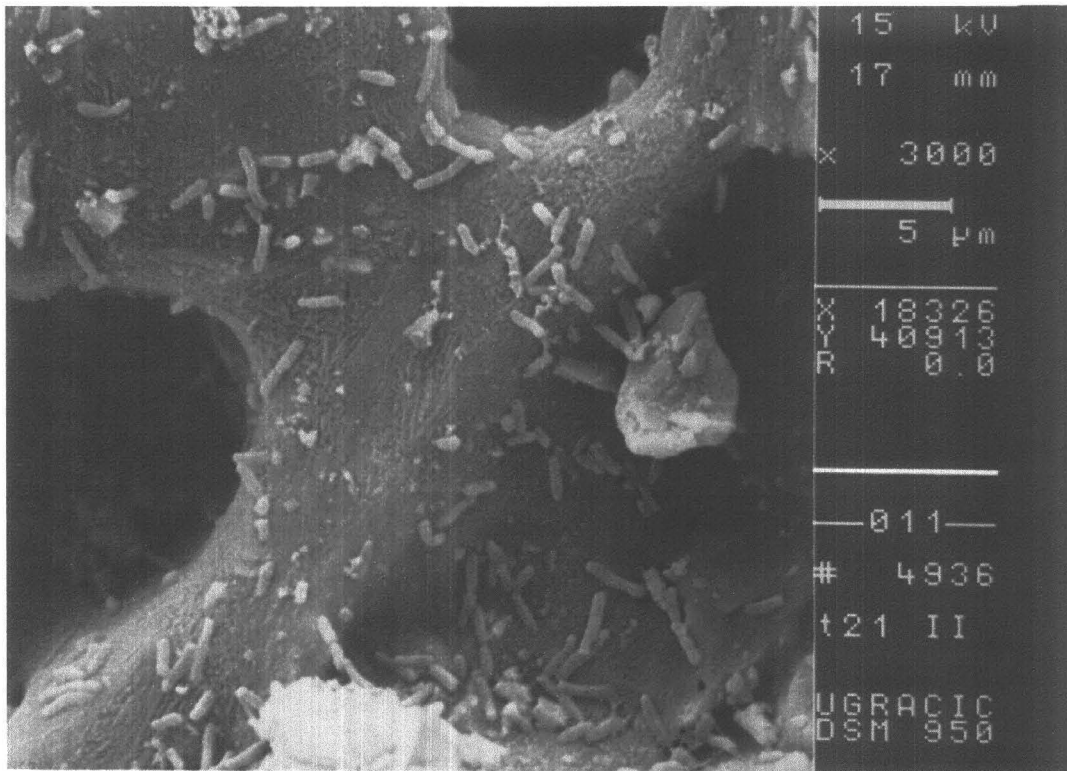


Fig V.21. Muestra de relleno tras 72 horas de recirculación, empleando cultivo de *Ps. mendocina* y un nuevo material soporte procedente del rechazo por rotura.

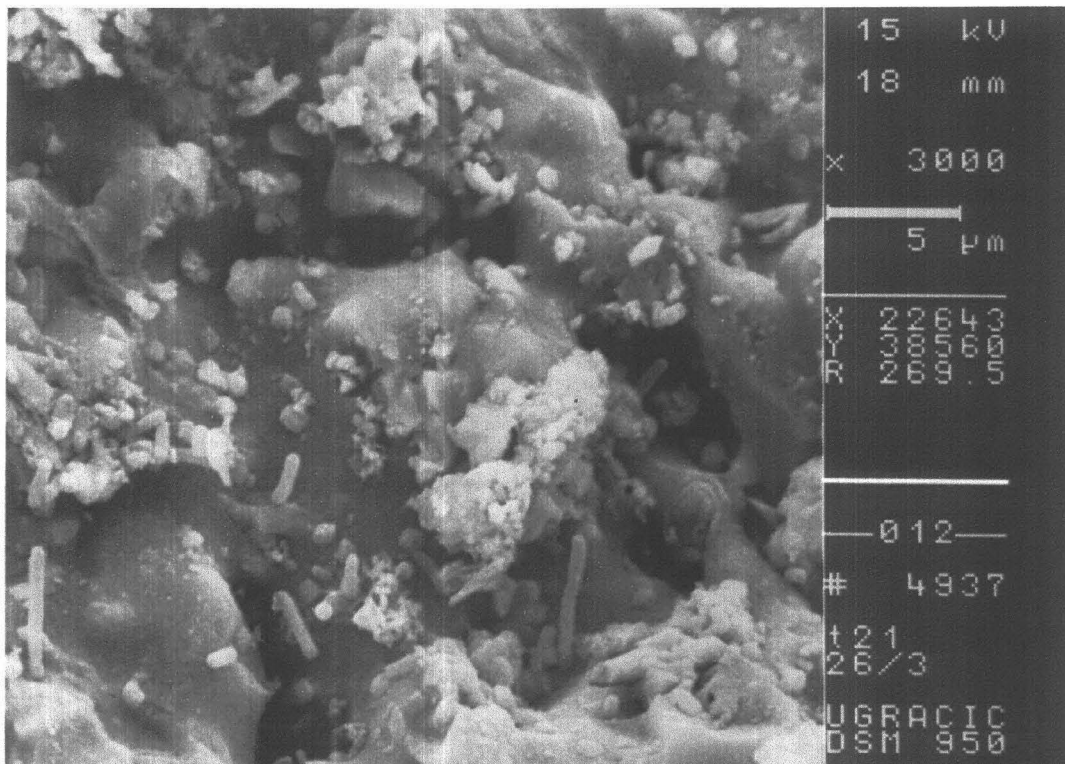


Fig V.22. Muestra de relleno tras 72 horas de recirculación y 24 horas de funcionamiento, empleando cultivo de *Ps. mendocina* y un nuevo material soporte procedente del rechazo por rotura.

Como puede apreciarse, tras los ensayos realizados, el mal funcionamiento del sistema parece ser provocado por problemas de adherencia de la cepa ensayada, por lo que se pensó realizar un ensayo empleando un adherente, para facilitar la unión de la cepa bacteriana a la biopelícula.

El estudio con el adherente se realizó empleando como tal exopolisacárido (EPS) procedente de una cepa de *Volcaniella eurihalina*, microorganismo halófilo capaz de formar grandes cantidades de EPS con buenas propiedades reológicas y de adherencia. Son eubacterias Gram negativas con formas bacilares de pequeño tamaño y células capsuladas con diámetro de 0.8-1 μm y 2-2.5 μm de longitud. El EPS fue obtenido a partir de un cultivo puro, centrifugando y precipitando el polímero desde el sobrenadante con etanol frío. El material obtenido se purificó mediante dialización. Estos ensayos de extracción de EPS se realizaron por microbiólogos pertenecientes al grupo de investigación Microbiología y Técnicas Ambientales.

Se pusieron en recirculación 450 ml al 0,5% de EPS durante 4 horas y posteriormente el medio de cultivo de *Pseudomonas mendocina* durante 21 horas de recirculación. Tras las 24 horas de recirculación se analizó el relleno, no detectándose actividad desnitrificante. Puesta en marcha la planta tras la recirculación se observó que no se eliminaba nitrato en el agua.

En las fotografías realizadas mediante microscopía de barrido de superficie tras la recirculación (realizada 4 horas con EPS y 21 horas con el cultivo de *Ps. mendocina*) y tras las 24 horas de funcionamiento (figuras V.23. y V.24., respectivamente) se observó que aunque no llegaba a formarse biopelícula, la colonización fue más abundante que en el resto de pruebas realizadas, no siendo sin embargo efectivo el proceso.

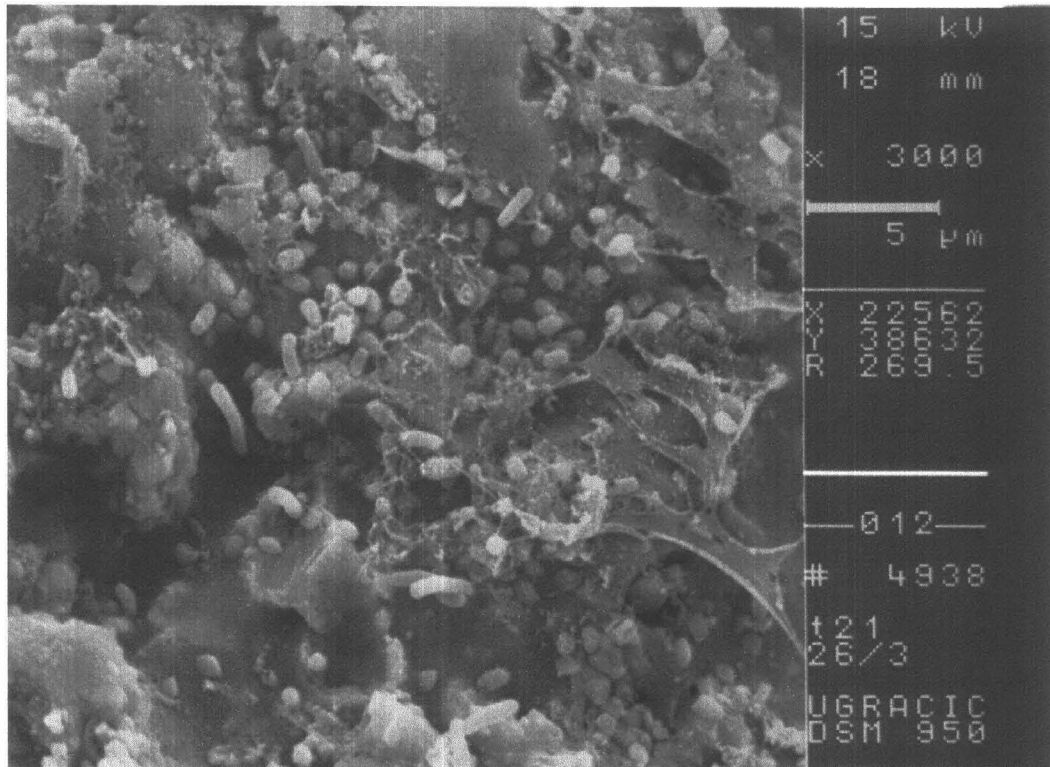


Fig V.23. Muestra de relleno tras 4 horas en recirculación con EPS y 21 horas con el cultivo de *Ps. mendocina*.

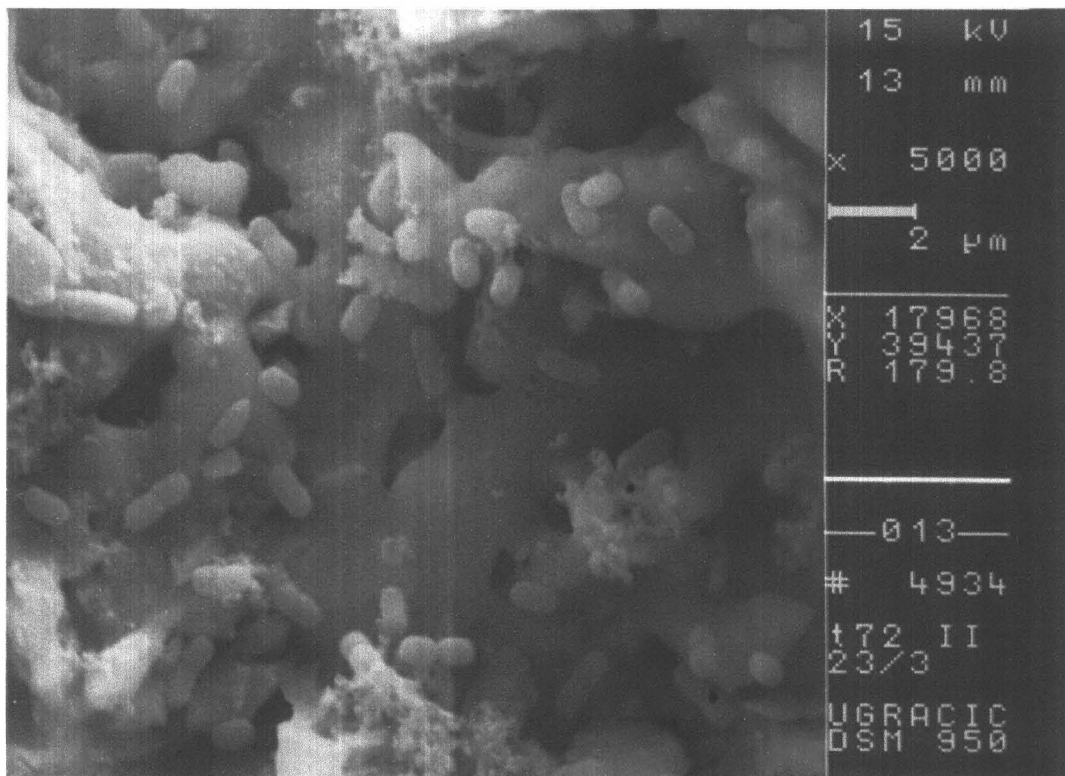


Fig V.24. Muestra de relleno tras 4 horas en recirculación con EPS y 21 horas con el cultivo de *Ps. mendocina* y 24 horas de funcionamiento. (Foto a mayor aumento para apreciar la colonización del sistema).

V.3.3.- Conclusiones previas

Tras todos los ensayos realizados en esta primera fase de la investigación, se llegó a la conclusión de que el problema de la baja actividad del sistema estaba provocada por la poca adherencia de los microorganismos, fenómeno que no se pudo mejorar ni disminuyendo la carga hidráulica, ni aumentando el tiempo de recirculación, ni empleando adherentes. El problema pudo ser debido a que el medio de cultivo empleado no era el adecuado para el crecimiento de los mismos, poniéndose inóculos en recirculación con una baja densidad bacteriana. Así pues, se varió el medio de cultivo para obtener un mayor crecimiento, modificándose en los siguientes aspectos:

- Se empleó agua destilada en lugar de agua de pozo, evitando así el problema de los precipitados de carbonato.
- Se incrementó la relación C/N a 38, siguiendo las indicaciones de Rodina, A.G. (1972) de medios de cultivo óptimos para crecimiento de microorganismos desnitrificantes. Altos valores en la relación C/N mejoran la producción de EPS para algunos microorganismos (Cerning, 1990).
- Se empleó como fuente de carbono sacarosa, ya que para concentraciones elevadas el etanol es tóxico para los microorganismos. Por otro lado, la sacarosa mejora la formación de EPS en determinados microorganismos (Congregado y col., 1985; Cerning y col., 1994).
- Se añadió extracto de levadura al 0.1% para evitar problemas por falta de cofactores, ya que dicho extracto proporciona vitaminas, proteínas y otros compuestos necesarios para el crecimiento de la cepa.

Para comparar el crecimiento de *Pseudomonas mendocina* en este medio y en el empleado hasta ahora en la investigación, puestos en agitador orbital a 30 °C, se midió la absorbancia a 640 nm y a distintas horas de incubación. Con esta medida se obtiene el grado de turbidez, el cual está correlacionado con el número de microorganismos existentes en cada momento y con esto el crecimiento que se estaba produciendo para las dos relaciones C/N ensayadas (C/N = 1 y C/N = 38).

Los valores de absorbancia obtenidos a diferentes horas para las dos relaciones anteriores se indican en la siguiente tabla:

Tabla V.1. Medida de la absorbancia para diferentes relaciones C/N

Tiempo (horas)	Absorbancia a 640 nm	
	C/N = 1	C/N = 38
0	0	0
15	0.083	0.120
24	0.232	0.300
39	0.208	0.359
48	0.222	0.410
72	0.220	0.410

Como puede apreciarse, el crecimiento es considerablemente mayor para el medio de cultivo con relación C/N = 38, encontrándose el óptimo para 48 horas de incubación del mismo. Esta variación en el crecimiento bacteriano llevó a plantearnos el empleo de este medio de cultivo para el crecimiento previo de la bacteria a la inoculación, disponiendo en este caso de una densidad bacteriana muy superior a la que se dispuso en la 1ª fase.

V.4.- 2ª FASE DE LA INVESTIGACIÓN A ESCALA DE LABORATORIO

Dado que en la fase anterior de la investigación no se alcanzaron rendimientos óptimos en el funcionamiento del proceso de desnitrificación con el empleo de la inoculación selectiva para la formación de la biopelícula, y teniendo en cuenta las conclusiones previas obtenidas (apartado V.3.3.), se decidió continuar la investigación modificando las condiciones de trabajo en los siguientes aspectos:

- **Medio de cultivo** empleado para crecimiento de los microorganismos, modificando su composición de la forma indicada en el apartado V.3.3.
- Reducción del caudal de inoculación para minimizar el efecto de la carga hidráulica en el arrastre de la biopelícula. El nuevo caudal empleado fue de 5,7 l/d, obteniéndose así una **carga hidráulica de $2 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$** .
- **Eliminación del oxígeno disuelto presente en el agua a tratar**, dada su posible influencia negativa en el rendimiento del sistema. Para eliminar el oxígeno disuelto se empleó como reductor SO_3Na_2 en cantidades estequiométricas, según la concentración de oxígeno del agua a tratar.
- **Evitar posibles carencias de fósforo en el agua a tratar**, nutriente imprescindible para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos, para lo cual se adicionó $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ hasta obtener una concentración constante en el agua a tratar de 0,6 mg/l de fósforo.
- Incrementar el **tiempo de funcionamiento del sistema a 7 días**, para estudiar el rendimiento medio semanal del sistema en eliminación de nitrato así como la presencia de nitrito. Debido a las pequeñas dimensiones tanto de las plantas a escala de laboratorio como de los tubos de entrada/salida, para tiempos de funcionamiento superiores a 7 días se producía la colmatación del sistema, por lo que se decidió no prolongar más de una semana el funcionamiento de la planta para cada uno de los ensayos realizados, ya que ésta carecía de sistema de lavado.

V.4.1.- Variables y parámetros de la 2ª fase de la investigación de choque.

Las **VARIABLES** que se controlaron en el proceso fueron:

- **Empleo de diferentes inoculantes.** Debido a las dificultades presentadas para formar la biopelícula con la cepa empleada en la fase anterior, *Pseudomonas mendocina*, se incluye esta nueva variable para hacer un estudio comparativo entre inoculantes viendo las ventajas y desventajas de uno u otro en la fase de inoculación y por tanto en el rendimiento del sistema. Los inoculantes empleados fueron tres:
 - a) Licor mezcla: inoculante con alta carga bacteriana empleado en anteriores estudios (Gómez, M.A., *et al*, 2000), el cual permitía la rápida formación de la biopelícula.
 - b) *Pseudomonas mendocina*: cepa empleada en la 1ª fase de la investigación de choque.
 - c) *Agrobacterium radiobacter*: cepa con actividad desnitrificante muy alta aislada de biopelículas desnitrificantes tanto en presencia como en ausencia de oxígeno disuelto. Su procedencia es semejante a *Pseudomonas mendocina*, creciendo abundantemente en el medio de cultivo empleado para la inoculación y no afectando la presencia de oxígeno disuelto a su actividad desnitrificante
- **Tiempo de recirculación** necesario para la formación de la biopelícula, empleando licor mezcla o el medio de cultivo indicado anteriormente inoculado con cada una de las cepas anteriores (*Agrobacterium radiobacter* o *Pseudomonas mendocina*). Se ensayó con cuatro tiempos de recirculación, 1, 3, 5 y 9 días, tratando de estudiar su influencia en la formación de una biopelícula estable.

Los **PARÁMETROS** que se controlaron en el proceso fueron los siguientes:

- **Sobre el relleno**, tomando muestras una vez finalizada la recirculación y tras 7 días de puesta en marcha, se analizaron:
 - a) Recuento de microorganismos adheridos al material soporte, parámetro que asesora acerca de la densidad bacteriana sobre el relleno (tamaño de la biopelícula).
 - b) Actividad desnitrificante, parámetro que da idea de la capacidad potencial de eliminar nitrato del sistema inoculado.
 - c) Microscopía de barrido de superficie, que permite ver la formación de la biopelícula para los diferentes tiempos de recirculación confirmando la colonización del relleno.

- **Sobre el agua tratada**, tomando muestras diarias de agua a lo largo de la fase de funcionamiento del sistema, se analizaron:
 - a) Concentración de nitrato y nitrito en el agua tratada para comprobar el rendimiento de la planta en eliminación de nitrógeno. La concentración de nitrito también asesora sobre la evolución de las formas oxidadas de nitrógeno en el medio.
 - b) Turbidez y recuento de microorganismos. Ambos parámetros nos daban idea del posible desprendimiento de la biopelícula del relleno y de la necesidad de tratamientos posteriores del agua desnitrificada.
 - c) Coliformes totales. Se incluye la determinación de un indicador de contaminación fecal para comprobar si se puede colonizar la biopelícula con patógenos y éstos desprenderse al agua tratada, lo que obligaría a mayores tratamientos posteriores.

La FRECUENCIA DE LOS MUESTREOS fue la siguiente:

- Los parámetros que se controlaron **sobre las muestras de relleno** se analizaron tras finalizar el periodo de recirculación, de 1, 3, 5 ó 9 días, y terminado el funcionamiento de la planta para cada uno de los tiempos de recirculación y para cada uno de los inoculantes empleados. Para cada ensayo, la planta se mantuvo en funcionamiento durante una semana.
- Los parámetros que se controlaron **sobre las muestras de agua** se analizaron diariamente a lo largo de la fase del funcionamiento del sistema, para cada uno de los tiempos de recirculación ensayados y para cada uno de los tres inoculantes empleados en la recirculación.

V.4.2.- Resultados previos de la 2ª fase

La densidad bacteriana obtenida en el medio de cultivo para cada una de las cepas empleadas tras crecimiento durante 48 horas a 30 °C en agitador orbital fue:

- *Pseudomonas mendocina*: $4,7 \cdot 10^{11}$ ufc/ml.
- *Agrobacterium radiobacter*: $3 \cdot 10^{11}$ ufc/ml.

El recuento realizado sobre el licor mezcla empleado en la inoculación dio una densidad bacteriana de $5,36 \cdot 10^{15}$ ufc/ml.

Como puede comprobarse la mayor densidad bacteriana la presentó el licor mezcla, sin embargo no todos los microorganismos presentes en este inoculante eran desnitrificantes.

Con cada uno de estos inoculantes se procedió a la formación de la biopelícula recirculándolos a través del filtro sumergido durante diferentes tiempos de recirculación.

V.4.2.1.- Resultados sobre las muestras de relleno

En el análisis realizado sobre el recuento de microorganismos tras la recirculación, representando la evolución frente a los días de recirculación para los tres inoculantes se obtuvieron los siguientes resultados:

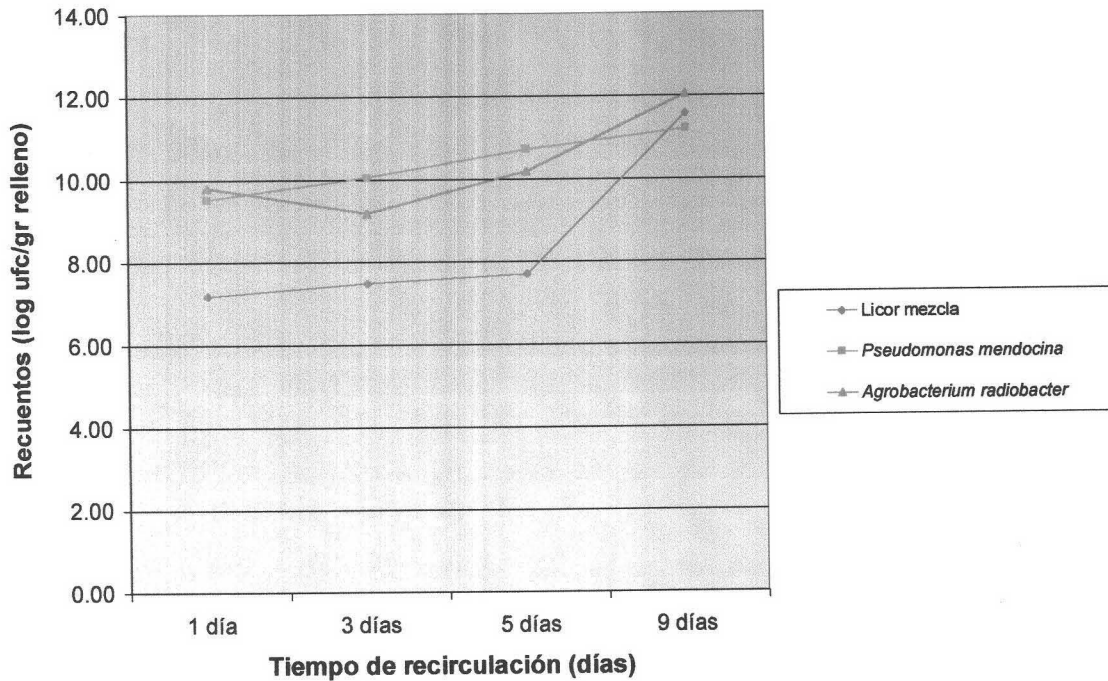


Fig. V.25.- Recuento de microorganismos en el relleno frente a los días de recirculación para diferentes inoculantes

El número de microorganismos presentes en el material relleno tras la inoculación fue mayor para los dos cultivos puros que para el licor mezcla, a pesar de contar éste con mayor carga bacteriana inicial. Esto nos indica que los dos cultivos puros empleados se adhieren mejor al relleno en las nuevas condiciones de trabajo, sin incrementar excesivamente al aumentar el tiempo de recirculación a diferencia de lo que sucedió con el licor mezcla para el cual se aprecia un aumento de casi 4 logaritmos entre 5 y 9 días de recirculación.

Tabla V.2.- Análisis estadístico realizado para los recuentos de microorganismos en el relleno tras la recirculación para los diferentes tiempos de recirculación ensayados y los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de recirculación	1	$1,05 \cdot 10^{24}$	$1,05 \cdot 10^{24}$	17,95	0,0004
Inoculante	2	$2,49 \cdot 10^{23}$	$1,24 \cdot 10^{23}$	2,12	0,1463
Total (corregido)	23	$2,48 \cdot 10^{24}$			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
Licor mezcla	$9,19 \cdot 10^{10}$	A
<i>Ps. mendocina</i>	$5,66 \cdot 10^{10}$	A
<i>Ag. radiobacter</i>	$2,88 \cdot 10^{11}$	A

El recuento de microorganismos en el relleno tras la recirculación no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los tres inoculantes empleados, pero sí frente a los días de recirculación para cada uno de los inoculantes ensayados (P<0,05).

En el análisis realizado sobre el **recuento de microorganismos tras el funcionamiento**, representando la evolución frente a los días de recirculación para los tres inoculantes se obtuvieron los siguientes resultados:

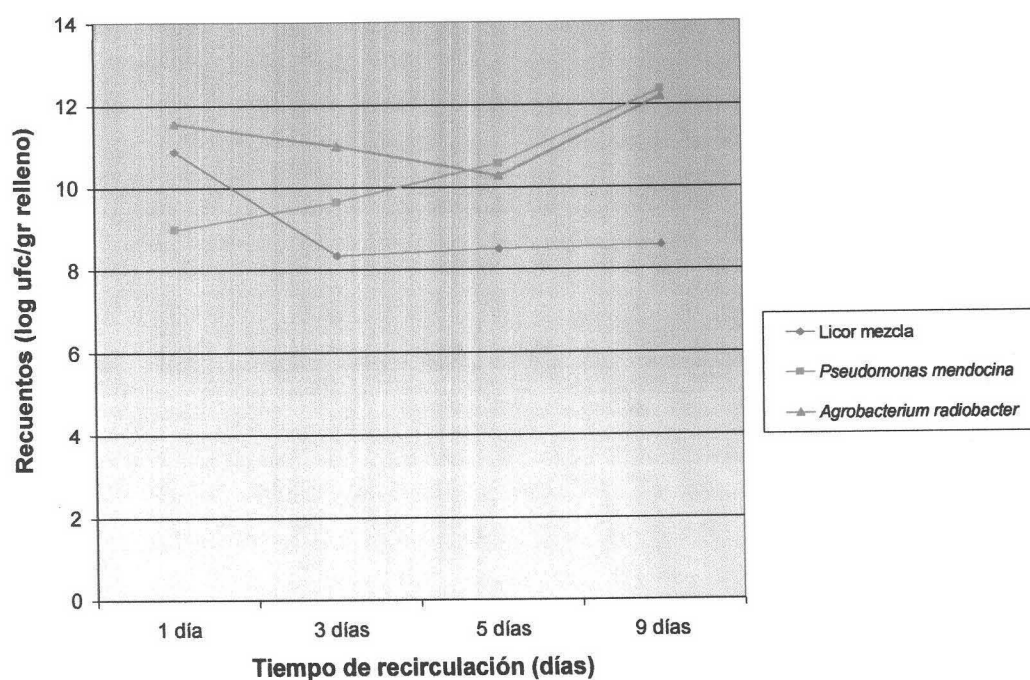


Fig. V.26.- Recuento de microorganismos en el relleno tras el funcionamiento frente a los días de recirculación para diferentes inoculantes

Tabla V.3.- Análisis estadístico realizado para los recuentos de microorganismos en el relleno tras el funcionamiento para los diferentes tiempos de recirculación ensayados y los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de recirculación	1	$4,58 \cdot 10^{24}$	$4,58 \cdot 10^{24}$	14,96	0,0010
Inoculante	2	$1,47 \cdot 10^{24}$	$7,37 \cdot 10^{23}$	2,41	0,1155
Total (corregido)	23	$1,28 \cdot 10^{25}$			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
Licor mezcla	$1,93 \cdot 10^{10}$	A
<i>Ps. mendocina</i>	$5,81 \cdot 10^{11}$	A
<i>Ag. radiobacter</i>	$5,01 \cdot 10^{11}$	A

El recuento de microorganismos en el relleno tras el funcionamiento tuvo un comportamiento estadístico similar al obtenido tras la recirculación: no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los inoculantes empleados, pero sí frente a los días de recirculación para cada uno de los inoculantes. En el caso de emplear la inoculación selectiva el número de microorganismos medio incrementó tras el funcionamiento, mientras que para el licor mezcla disminuyó.

Si se representa la diferencia en el recuento de microorganismos obtenidos una vez finalizado el período de funcionamiento y finalizado el período de recirculación, para los diferentes inoculantes y los diferentes tiempos de recirculación ensayados, se obtienen los siguientes resultados:

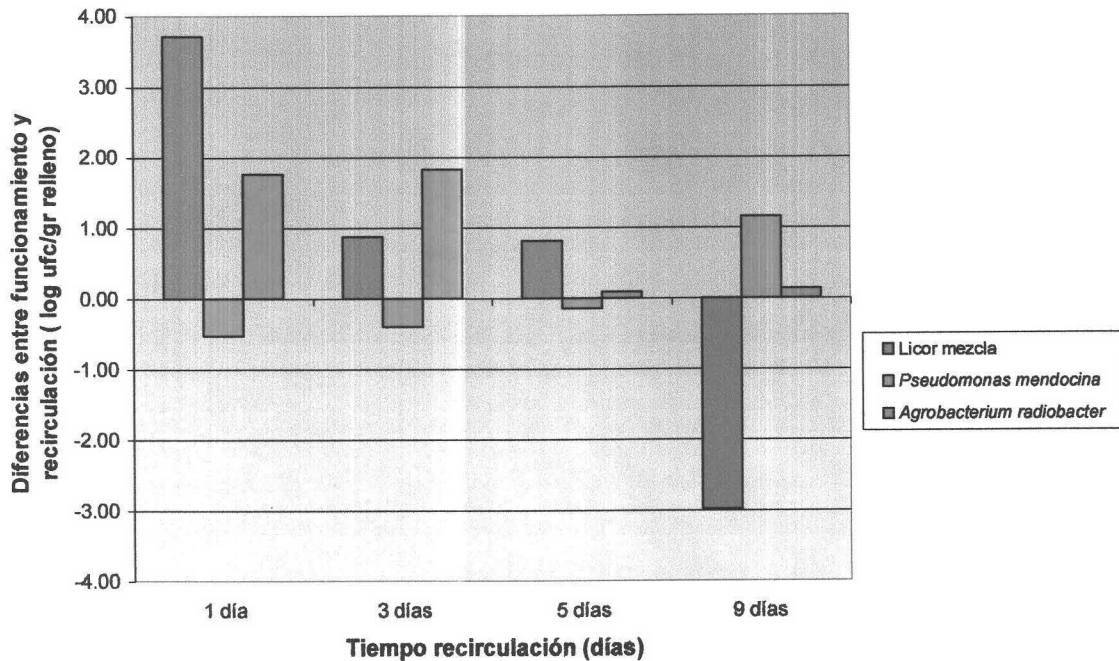


Fig.V.27. Diferencias entre recuentos de microorganismos tras funcionamiento y recirculación para los diferentes inoculantes y los diferentes tiempos de recirculación

Como puede comprobarse en la figura V.27., para el licor mezcla el número de microorganismos incrementa tras la puesta en funcionamiento, siendo cada vez menor este incremento al aumentar el tiempo de recirculación llegando incluso a ser negativo para 9 días. Esto es indicativo de biopelícula más estable con menor tiempo de recirculación a pesar de ser menor en número. En el caso de emplear *Pseudomonas mendocina* como inoculante se necesita mayor tiempo de recirculación para que la biopelícula formada sea estable, siendo la biopelícula formada a partir de *Agrobacterium radiobacter* la que mejor se adhirió al relleno, proliferando el número de microorganismos con el funcionamiento del sistema en todos los casos ensayados. Esta biopelícula tampoco se vió favorecida con el tiempo de recirculación.

Este diferente comportamiento observado para cada uno de los inoculantes empleados pone de manifiesto la importancia de la fase inicial de inoculación, donde tanto el inoculante empleado como el tiempo de recirculación son dos factores importantes que definirán la formación de la biopelícula. A excepción de la inoculación realizada con *Ps. mendocina*, para la cual se precisó de 9 días para obtener una biopelícula estable, para los otros dos casos basta con 24 horas de recirculación para

obtener dicha biopelícula, reduciendo considerablemente el tiempo necesario para esta fase.

En el análisis realizado sobre la actividad desnitrificante finalizada la recirculación, representando la evolución frente a los días de recirculación para los tres inoculantes se obtuvo el siguiente resultado:

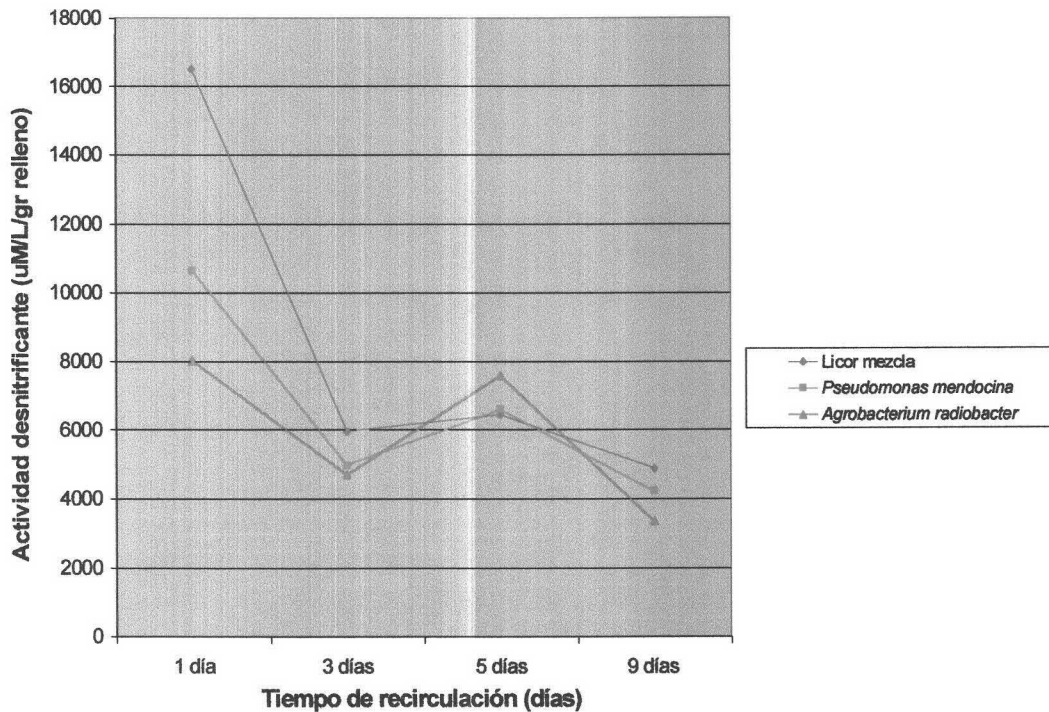


Fig.V.28. Actividad desnitrificante en el relleno frente a los días de recirculación para diferentes inoculantes

Según los resultados obtenidos, para los tres inoculantes empleados la actividad desnitrificante fue variable con el tiempo de recirculación, siendo alta para 1 día de recirculación en los tres casos y descendiendo hasta equilibrarse de igual modo para los tres inoculantes para valores de 3 a 5 días de recirculación.

Tabla V.4.- Análisis estadístico realizado para la actividad desnitrificante en el relleno tras la recirculación para los diferentes tiempos de recirculación ensayados y los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de recirculación	1	1,231	1,231	14,87	0,001
Inoculante	2	2,758	1,379	1,67	0,2141
Total (corregido)	23	3,161			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
Licor mezcla	8441,75	A
<i>Ps. mendocina</i>	6598,88	A
<i>Ag. radiobacter</i>	8441,75	A

Existen diferencias estadísticamente significativas de la actividad desnitrificante en el relleno frente a los días de recirculación, pero no frente a los inoculantes. Los valores fueron semejantes en los tres casos, siendo algo más destacables para el caso del licor mezcla.

Si se representa la diferencia en la actividad desnitrificante obtenida una vez finalizado el período de funcionamiento y finalizado el período de recirculación, para los diferentes inoculantes y los diferentes tiempos de recirculación ensayados, se obtienen los resultados indicados en la figura V.29.

La actividad desnitrificante aumentó transcurrido el período de funcionamiento del sistema en el caso de emplear licor mezcla o *Agrobacterium radiobacter* y para tiempos de recirculación de 1 ó 9 días, mientras que si se emplea como inoculante *Pseudomonas mendocina* aumenta transcurrido el funcionamiento únicamente para 9 días de recirculación.

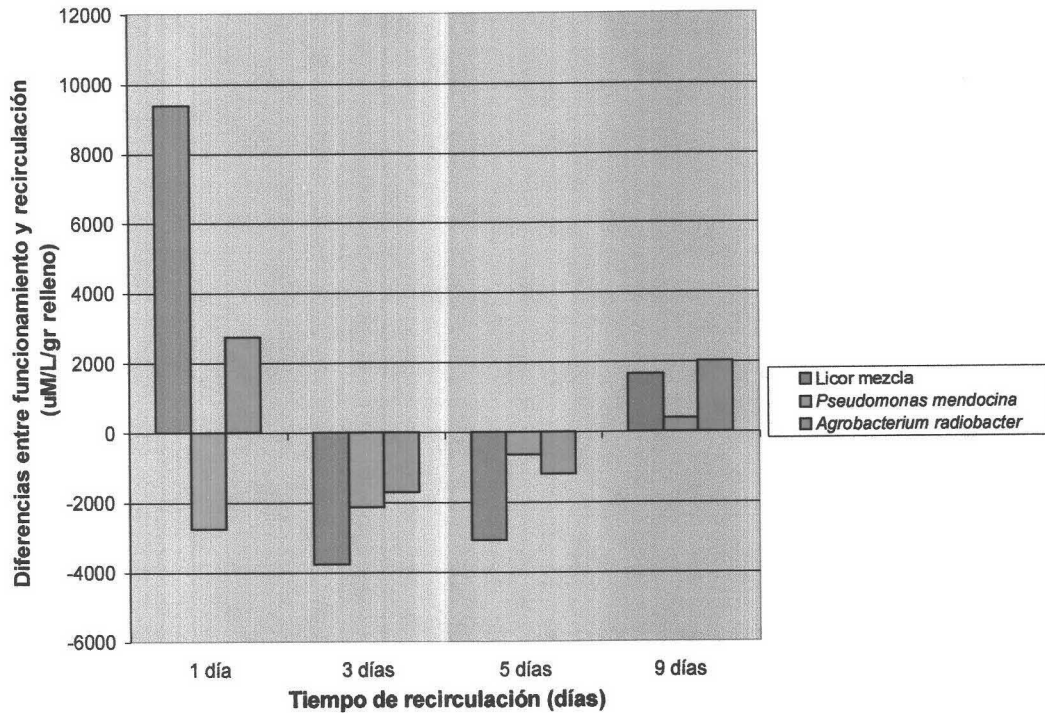


Fig. V.29. Diferencias en actividad desnitrificante tras funcionamiento y recirculación para los diferentes inoculantes y los diferentes tiempos de recirculación

El descenso de la actividad desnitrificante así como la pérdida de densidad bacteriana en la biopelícula formada por *Ps. mendocina* muestra este inoculante como poco adecuado frente a la formación de biopelículas más estables en el caso de los otros dos inoculantes, los cuales dan lugar en tan solo 24 horas a sistemas de desnitrificación potencialmente adecuados para eliminar nitrato de agua subterránea contaminada.

Considerando conjuntamente las diferencias entre recuento de microorganismos (Fig. V.27.) y las diferencias en actividad desnitrificante (Fig. V.29.) tras funcionamiento y recirculación para los diferentes inoculantes, es decir lo que se denomina poder desnitrificante, se observa que el mejor comportamiento corresponde a la biopelícula formada por *Agrobacterium radiobacter*.

Se observaron mediante microscopía de barrido de superficie las muestras de relleno tras las recirculaciones y tras el período de funcionamiento. En el caso de emplear *Agrobacterium radiobacter* para la inoculación del filtro y con tiempo de recirculación de 1 día se obtuvieron las siguientes fotos (Figs. V.30 y V.31.):

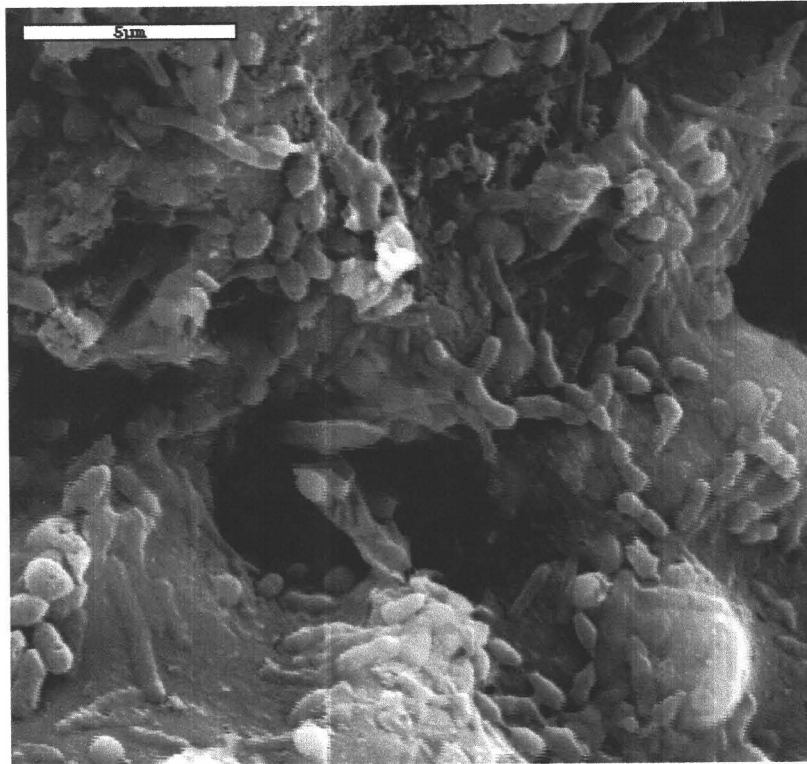


Fig V.30. Fotografía obtenida mediante microscopía de barrido de superficie para la inoculación realizada con *Agrobacterium radiobacter*, tras 1 día de recirculación del inóculo.

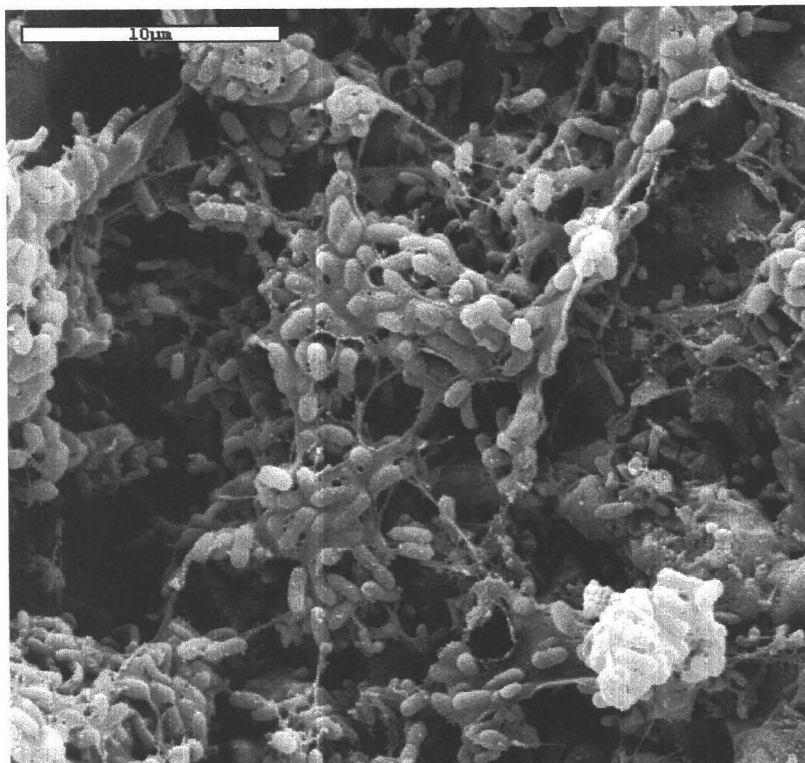


Fig V.31. Fotografía obtenida mediante microscopía de barrido de superficie para la inoculación realizada con *Agrobacterium radiobacter*, tras 1 día de recirculación del inóculo y tras el período de funcionamiento de 1 semana.

En las fotografías anteriores, se observa el incremento y la estabilidad de la biopelícula tras el período de funcionamiento. El resto de fotografías obtenidas mediante microscopía de barrido de superficie presentaron un aspecto semejante a éstas, aunque en el caso de emplear licor mezcla o *Pseudomonas mendocina* el incremento y la estabilidad de la biopelícula se apreciaba en menor cuantía que para el caso de emplear *Agrobacterium radiobacter*.

V.4.2.2.- Resultados sobre las muestras de agua

Con el análisis realizado de la concentración de nitrato y nitrito en el agua de salida se obtiene el valor de **nitrógeno total diario** una vez puesto en funcionamiento el sistema para los diferentes tiempos de recirculación y para los diferentes inoculantes. En ningún momento se apreció amonio en el medio y la concentración de nitrógeno orgánico se consideró despreciable (valores inferiores a 0,05mg/l de nitrógeno orgánico).

Tabla V.5.- Análisis estadístico realizado para el nitrógeno total en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados y los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de recirculación	1	489,598	489,598	25,02	0,0000
Inoculante	2	376,474	188,237	9,62	0,0001
Total (corregido)	251	5718,11			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
Licor mezcla	4,633	A
<i>Ps. mendocina</i>	6,160	B
<i>Ag. radiobacter</i>	3,166	C

Como puede comprobarse con el análisis estadístico realizado, existen diferencias estadísticamente significativas para el nitrógeno total en el agua de salida entre los inoculantes y entre los días de recirculación, siendo el que mejores resultados presentó el sistema inoculado con *Ag. radiobacter*.

De los datos anteriores sobre la formación y actividad de la biopelícula se desprende que los sistemas con licor mezcla y *Ag. radiobacter* presentaban condiciones más idóneas para la eliminación de nitrato, mientras que en el caso de *Ps. mendocina* las condiciones eran más desfavorables. Esto se puede apreciar en la capacidad de eliminar nitrógeno, apareciendo concentraciones más altas para el sistema con *Ps. mendocina* y menores en los otros dos. En todo caso el proceso con *Ag. radiobacter* fue más efectivo a pesar de contar con una biopelícula menos estable que para licor mezcla. Esto es debido a la formación de una biopelícula más homogénea y rica en desnitrificantes, mientras que en el caso de licor mezcla hay mayor variedad microbiana.

- Licor mezcla:

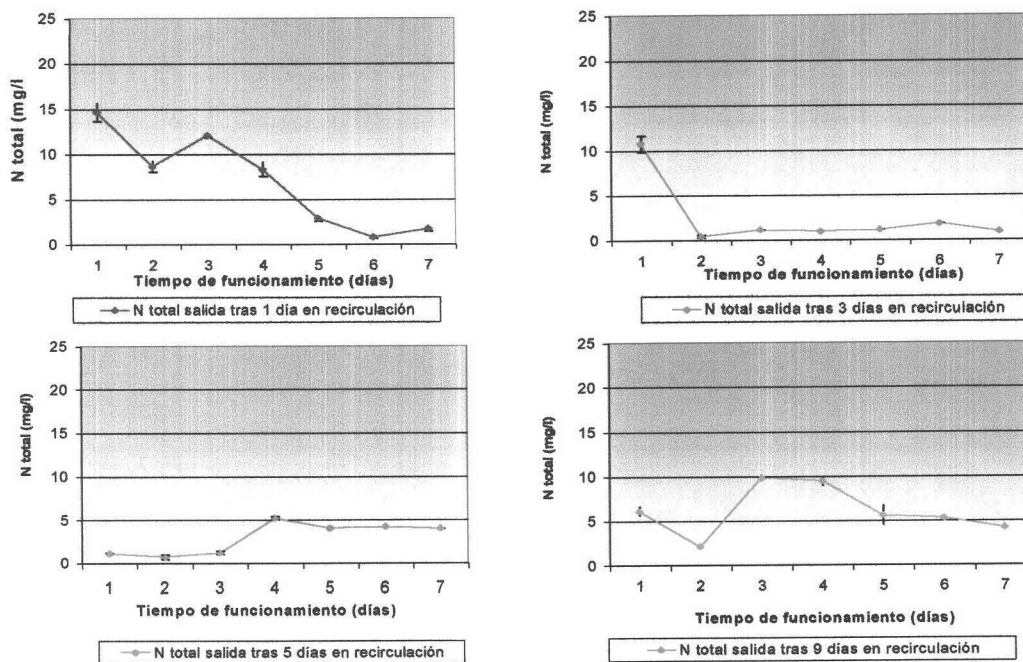


Fig. V.32. Nitrógeno total en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación empleando licor mezcla como inoculante.

(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Tabla V.6.- Análisis estadístico realizado para el nitrógeno total en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados con licor mezcla como inoculante.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	152,658	152,658	14,84	0,0002
Días de recirculación	3	318,836	106,279	10,33	0,0000
Total (corregido)	83	1284,17			

Test t de Student (P<0.05)		
Días de recirculación	Media	Grupo
1 día	6,998	A
3 días	2,482	B
5 días	2,955	B
9 días	6,098	A

Se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para el nitrógeno total en el agua de salida de la planta inoculada con licor mezcla, tanto para los días de recirculación como para los días de funcionamiento. Se establecen dos grupos diferentes para los días de recirculación, 1 y 9 días por un lado y 3 y 5 días por otro, presentando peores resultados el primer grupo. Así pues, en el caso de inocular la planta con licor mezcla no es necesario mantenerla 9 días en recirculación, puesto que los rendimientos son peores que para 3 y 5 días. Se necesita más de 1 día de recirculación, siendo suficiente con 3 días.

Estos resultados muestran incoherencia con respecto a la actividad desnitrificante desarrollada por el sistema tras 24 horas de inoculación, sin embargo éste valor sólo muestra la potencialidad de eliminar nitrógeno. La biopelícula fue en todo caso estable, aunque no homogénea, y poco rica en desnitrificantes. Un incremento en el tiempo de recirculación pone de manifiesto un mejor rendimiento motivado por el enriquecimiento en desnitrificantes, los cuales proliferan frente al resto de microorganismos debido a las mejores condiciones de crecimiento de estas bacterias (ausencia de oxígeno, fuente de carbono fácilmente asimilable y presencia de nitrato). Estas condiciones fueron puestas de manifiesto por Gómez, *et al* (2000).

• *Pseudomonas mendocina*:

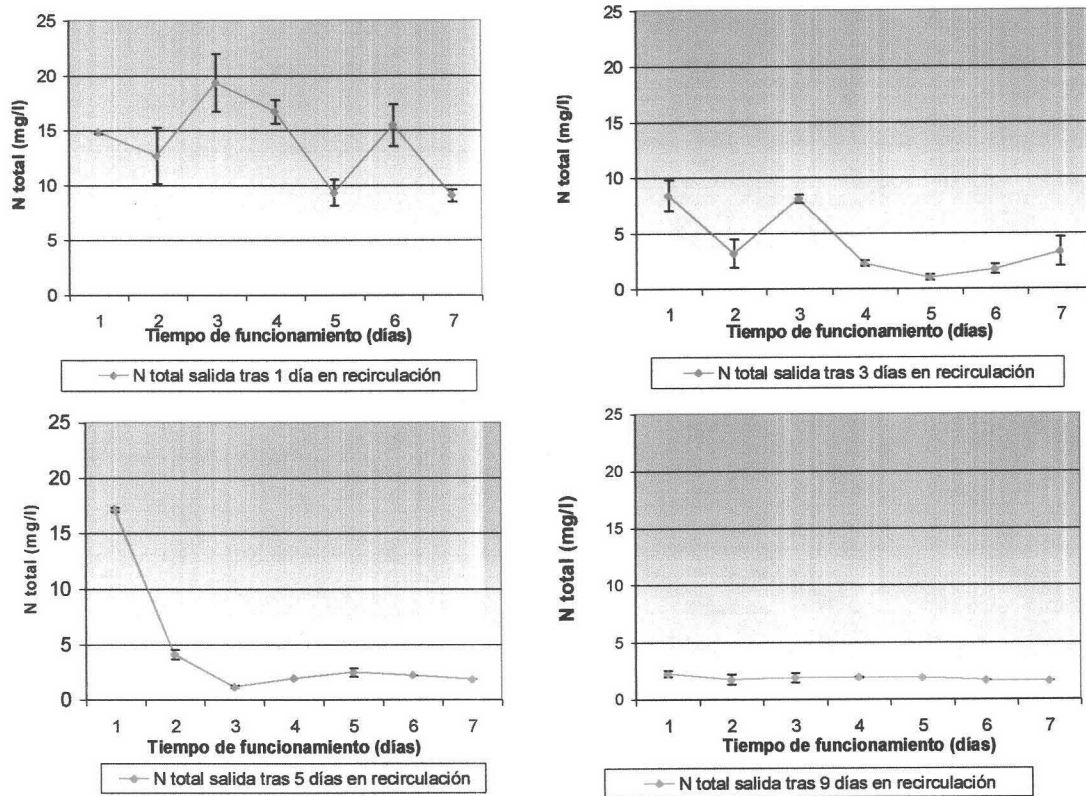


Fig. V.33. Nitrógeno total en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación empleando *Pseudomonas mendocina* como inoculante.

(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Tabla V.7.- Análisis estadístico realizado para el nitrógeno total en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados con *Pseudomonas mendocina* como inoculante.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	269,71	269,71	21,86	0,0000
Días de recirculación	3	1966,47	655,488	53,12	0,0000
Total (corregido)	83	3211,02			

Test t de Student (P<0.05)		
Días de recirculación	Media	Grupo
1 día	14,37	A
3 días	4,02	B
5 días	4,41	B
9 días	1,85	C

Existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para el nitrógeno total en el agua de salida de la planta inoculada con *Ps. mendocina*, tanto para los días de recirculación como para los días de funcionamiento. Se establecen tres grupos diferentes para los días de recirculación, 1 día por un lado, 3 y 5 días por otro y 9 días el tercer grupo, presentando los mejores resultados el tercer grupo. Así pues, en el caso de inocular la planta con *Ps. mendocina* es necesario mantenerla 9 días en recirculación, puesto que es cuando se obtienen mejores rendimientos.

Este microorganismo presentaba alta actividad desnitrificante, sin embargo la biopelícula formada era poco estable, precisándose varios días de recirculación para hacerla efectiva. Tras el tiempo de recirculación necesario esta biopelícula se mostró muy activa, sin embargo la larga duración de la fase inicial hace inviable el proceso.

- *Agrobacterium radiobacter*:

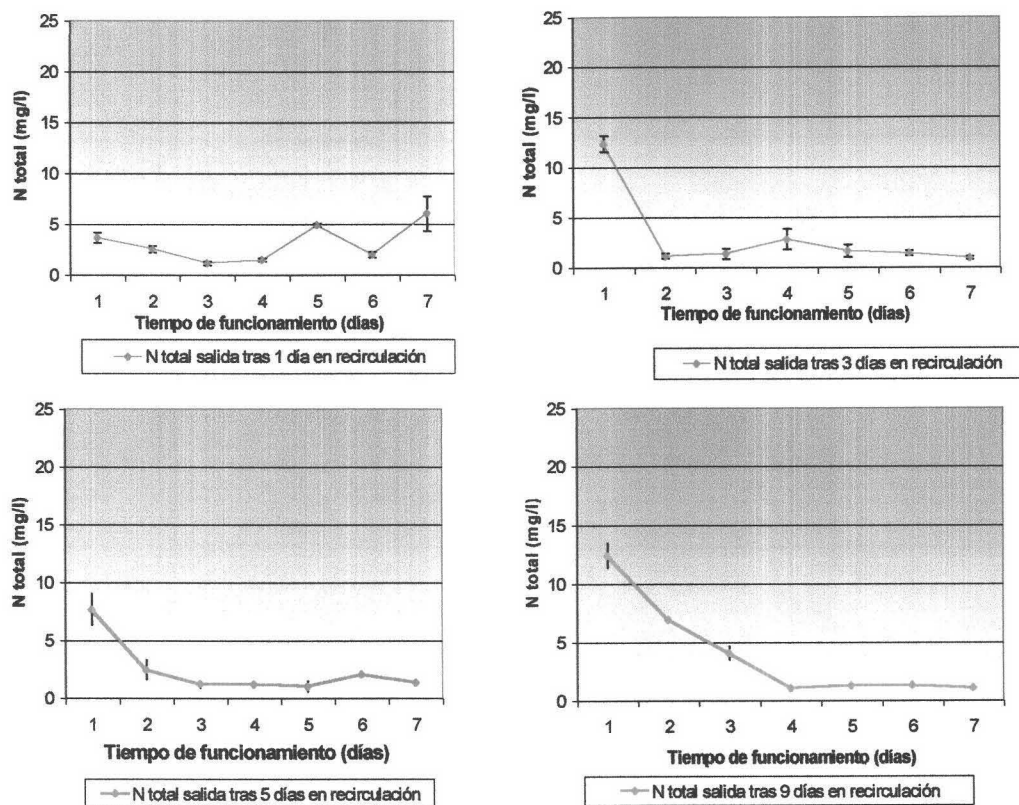


Fig. V.34. Nitrógeno total en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación empleando *Agrobacterium radiobacter* como inoculante.

(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Tabla V.8.- Análisis estadístico realizado para el nitrógeno total en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados con *Agrobacterium radiobacter* como inoculante.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	225,451	225,451	29,94	0,0000
Días de recirculación	3	26,166	8,722	1,16	0,3310
Total (corregido)	83	846,445			

Test t de Student (P<0.05)		
Días de recirculación	Media	Grupo
1 día	3,131	A
3 días	3,081	A
5 días	2,442	A
9 días	4,011	A

Existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para el nitrógeno total en el agua de salida de la planta inoculada con *Ps. mendocina* para los días de funcionamiento. Sin embargo, frente a los días de recirculación no se aprecian diferencias, siendo los 4 grupos homogéneos.

Para este microorganismo se encuentran los mejores rendimientos en eliminación de nitrógeno no siendo necesario más que un día de recirculación para obtener biopelículas activas. A pesar de no presentar tanta actividad desnitrificante como *Ps. mendocina* y no obtener una biopelícula tan estable como con licor mezcla, reunió los caracteres intermedios necesarios para sobresalir frente a los otros inoculantes. Se pone en este caso de manifiesto que es más necesario formar una biopelícula estable antes que hacerla desde un microorganismo con alta actividad y como un sistema homogéneo en bacterias desnitrificantes es más rentable que otras de tipo heterogéneo (Gómez, *et al*, 1999).

Representando gráficamente el valor medio de rendimiento en eliminación de nitrógeno total a lo largo de la semana que se mantuvo en funcionamiento para cada inoculante y para cada tiempo de recirculación ensayado, se obtiene el siguiente resultado:

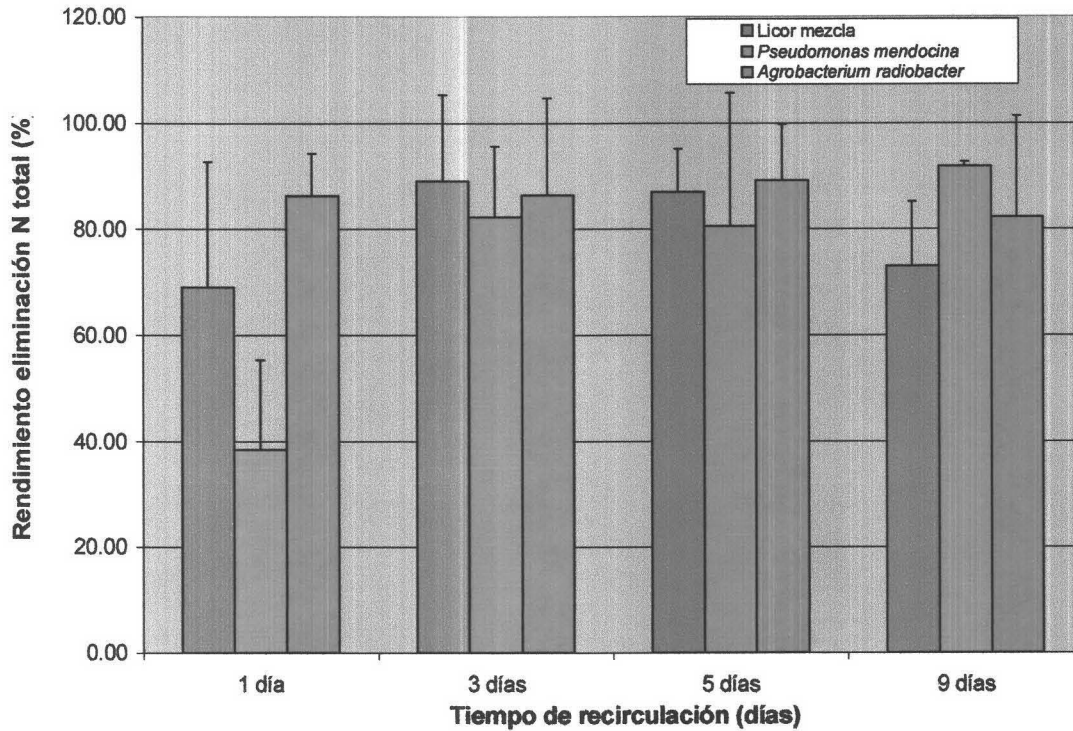


Fig. V.35. Rendimiento medio semanal en eliminación de N total para diferentes tiempos de recirculación y diferentes inoculantes

(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Como puede apreciarse en la figura V.35, el mayor rendimiento semanal y más estable en eliminación de nitrógeno se dió para el caso de emplear como inoculante *Agrobacterium radiobacter*. Los rendimientos no aumentan prácticamente con el tiempo de recirculación para este sistema, siendo únicamente considerable la diferencia en el caso de emplear *Pseudomonas mendocina* como inoculante para el que se obtiene el mayor rendimiento si se inocula el sistema durante 9 días; sin embargo, para la inoculación realizada con *Agrobacterium radiobacter* el rendimiento no mejora prácticamente para tiempos de recirculación superiores a 1 día, disminuyendo incluso si se mantiene el inóculo 9 días en recirculación.

Atendiendo a la **concentración diaria de nitrito en el agua de salida** una vez puesto en funcionamiento el sistema para los diferentes tiempos de recirculación y para cada uno de los inoculantes ensayados, se puede apreciar que existen diferencias estadísticamente significativas para el nitrito en el agua de salida entre los inoculantes y entre los días de recirculación, siendo licor mezcla y *Ag. radiobacter* los que mejores

resultados presentaron. Es necesario analizar la presencia de diferencias significativas entre los días de recirculación para cada inoculante.

Tabla V.9.- Análisis estadístico realizado para el nitrito en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados y los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de recirculación	1	319,526	319,526	11,99	0,0006
Inoculante	2	490,839	245,419	9,21	0,0001
Total (corregido)	251	7420,22			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
Licor mezcla	1,124	a
<i>Ps. mendocina</i>	4,092	b
<i>Ag. radiobacter</i>	1,140	a

Los resultados obtenidos para cada uno de los inoculantes empleados fueron:

- Licor mezcla:

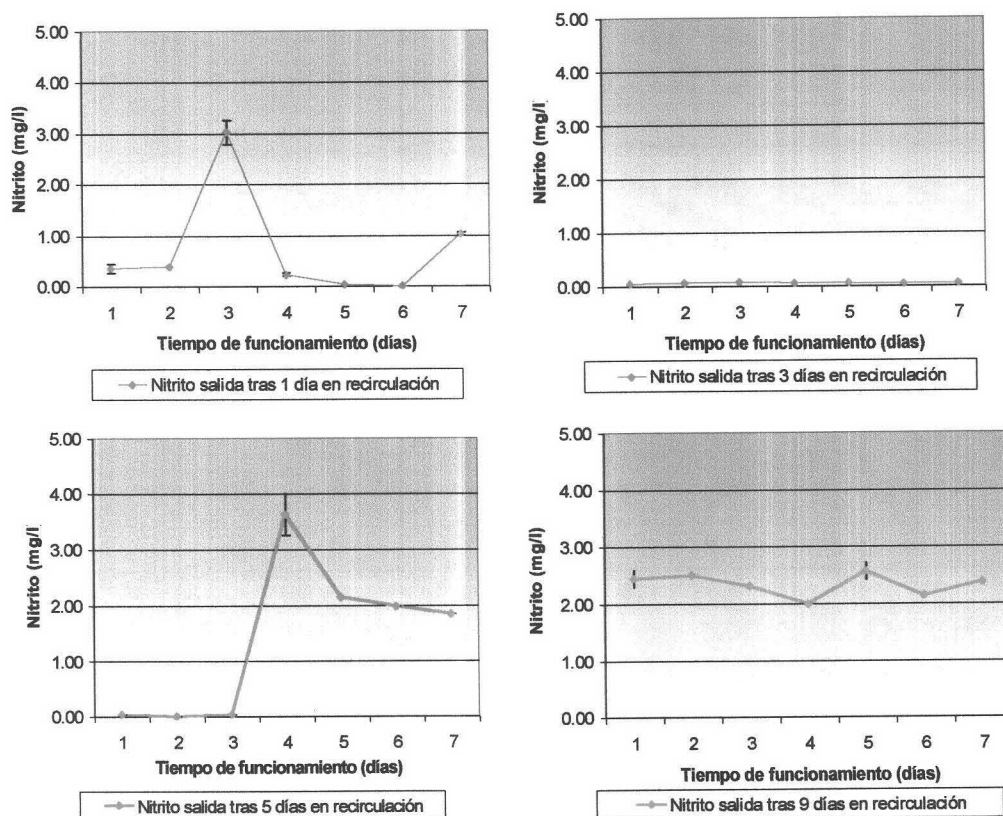


Fig. V.36. Concentración de nitrito en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación empleando licor mezcla como inoculante.

(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Tabla V.10.- Análisis estadístico realizado para el nitrito en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados con licor mezcla como inoculante.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	2,169	2,169	3,12	0,0810
Días de recirculación	3	59,484	19,828	28,54	0,0000
Total (corregido)	83	116,533			

Test t de Student (P<0.05)		
Días de recirculación	Media	Grupo
1 día	0,721	A
3 días	0,057	B
5 días	1,382	C
9 días	2,334	D

Existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los días de recirculación para los valores de nitrito en el agua de salida, en el caso de emplear licor mezcla como inoculante, siendo para 3 días cuando se obtienen mejores resultados.

Podemos apreciar un aumento en la concentración de nitrito en el agua de salida conforme se incrementa el tiempo de recirculación. Este fenómeno depende en parte de la composición de la biopelícula siendo la presencia de microorganismos reductores de nitrato y su relación frente a los desnitrificantes un factor condicionante de la mayor o menor concentración de este anión en el agua (Martienssen and Schöps, 1999). El tiempo de recirculación puede actuar como condicionante para el desarrollo de bacterias reductoras de nitrato que aumentan la producción de nitrito, no siendo capaces los microorganismos desnitrificantes de reducirlo desasimilatoriamente por completo.

● *Pseudomonas mendocina*:

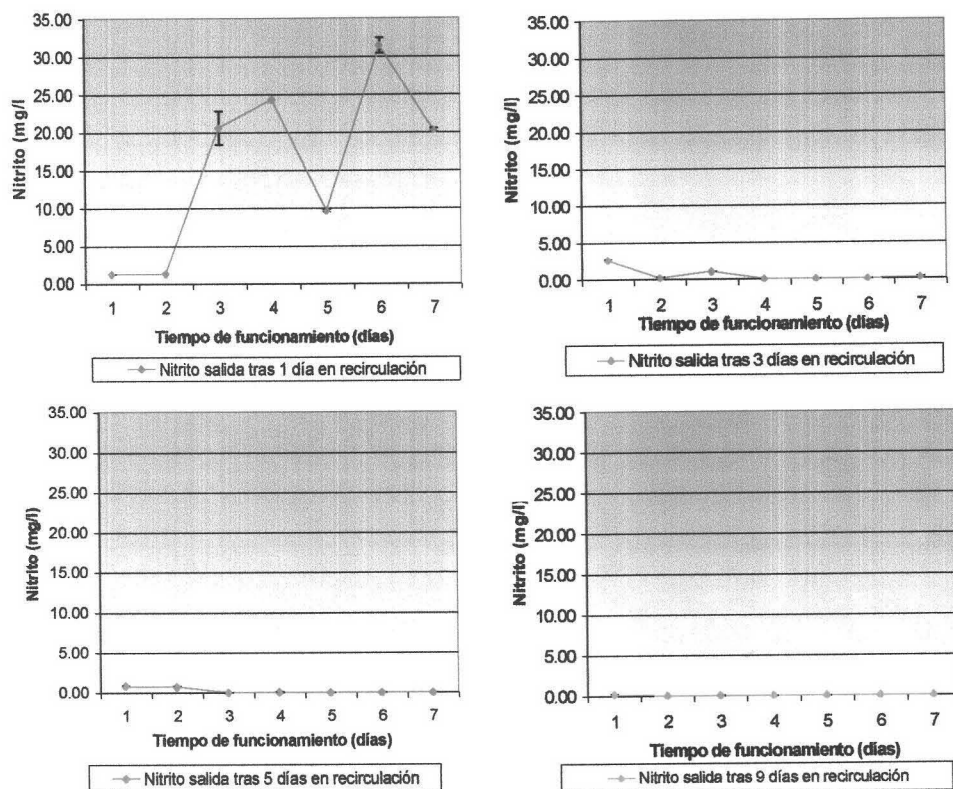


Fig. V.37. Concentración de nitrito en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación empleando *Pseudomonas mendocina* como inoculante.

(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Tabla V.11.- Análisis estadístico realizado para el nitrito en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados con *Pseudomonas mendocina* como inoculante.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	233,683	233,683	8,16	0,0055
Días de recirculación	3	3668,18	1222,73	42,70	0,0000
Total (corregido)	83	6163,98			
Test t de Student (P<0.05)					
Días de recirculación	Media	Grupo			
1 día	15,53	A			
3 días	0,57	B			
5 días	0,23	B			
9 días	0,03	B			

Existen diferencias estadísticamente significativas entre los días de funcionamiento para los valores de nitrito en el agua de salida, y entre los días de recirculación ($p < 0,05$)

estableciéndose dos grupos, uno para 1 día y otro para 3, 5 y 9 días, obteniéndose valores más bajos en este caso.

Otro de los factores condicionantes de la acumulación de nitrito en el medio es el tipo de microorganismo desnitrificante (Lazarova, *et al*, 1994); algunos de ellos no actúan frente al nitrito hasta reducir la concentración de nitrato a valores adecuados para su equipo enzimático, lo cual da lugar a una acumulación de nitrito. Este no es el caso de las cepas de *Ps. mendocina* y *Ag. radiobacter* empleadas en la inoculación selectiva, como se muestra en los bajos valores de nitrito en el medio a excepción de los ensayos con bajo tiempo de recirculación para *Ps. mendocina* y con alto tiempo de recirculación para *Ag. radiobacter*, situaciones en las cuales la biopelícula es poco estable. Para estos casos no se espera una influencia de microorganismos reductores de nitrato, siendo esto otra de las ventajas de las biopelículas obtenidas mediante inoculación selectiva.

- *Agrobacterium radiobacter*:

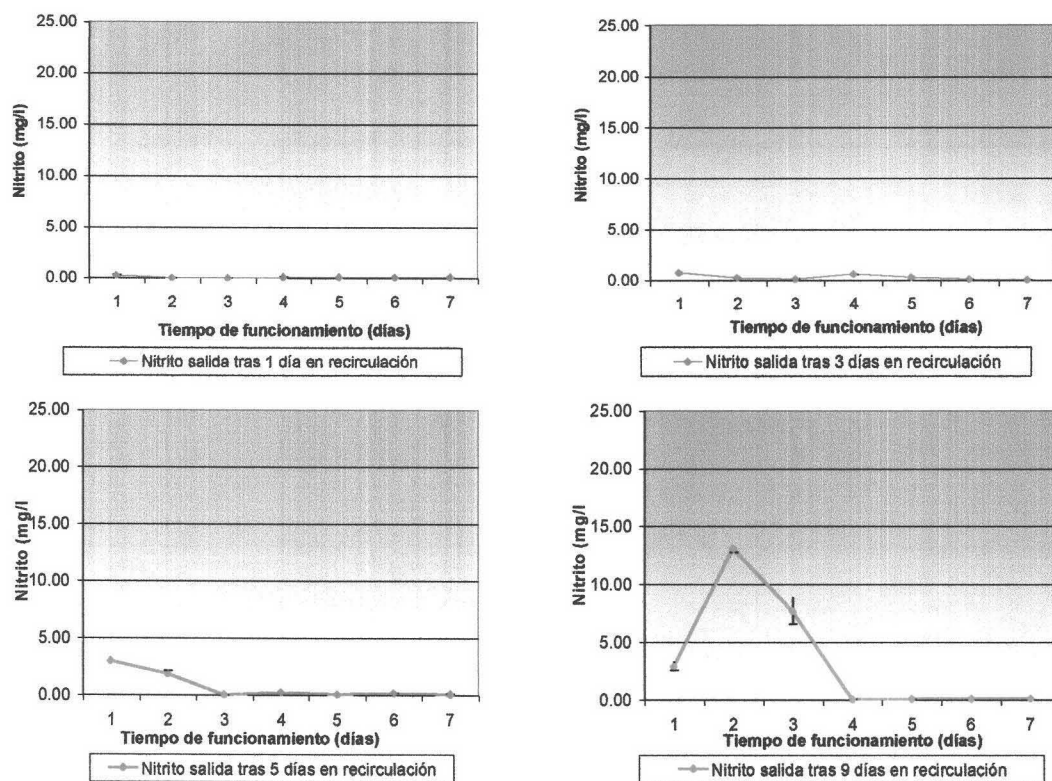


Fig. V.38. Concentración de nitrito en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación empleando *Agrobacterium radiobacter* como inoculante.

(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Tabla V.12.- Análisis estadístico realizado para el nitrito en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados con *Agrobacterium radiobacter* como inoculante.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	86,549	86,549	16,60	0,0001
Días de recirculación	3	150,548	50,183	9,63	0,0000
Total (corregido)	83	648,868			

Test t de Student (P<0.05)		
Días de recirculación	Media	Grupo
1 día	0,08	A
3 días	0,31	A
5 días	0,75	A
9 días	3,42	B

Atendiendo a los análisis realizados sobre la turbidez en el agua de salida una vez puesto en funcionamiento el sistema para los diferentes tiempos de recirculación y para cada uno de los inoculantes ensayados, podemos observar que existen diferencias estadísticamente significativas para este parámetro entre los inoculantes, pero no entre los días de recirculación, siendo el sistema inoculado con *Ag. radiobacter* el que presentó los valores más altos. En el caso de emplear licor mezcla o *Ps. mendocina* el comportamiento frente a la turbidez fue similar..

Tabla V.13.- Análisis estadístico realizado para la turbidez en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados y los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de recirculación	1	838,587	838,587	2,90	0,0899
Inoculante	2	8481,65	4240,82	14,66	0,0000
Total (corregido)	251	81077,9			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
Licor mezcla	14,189	A
<i>Ps. mendocina</i>	14,812	A
<i>Ag. radiobacter</i>	26,80	B



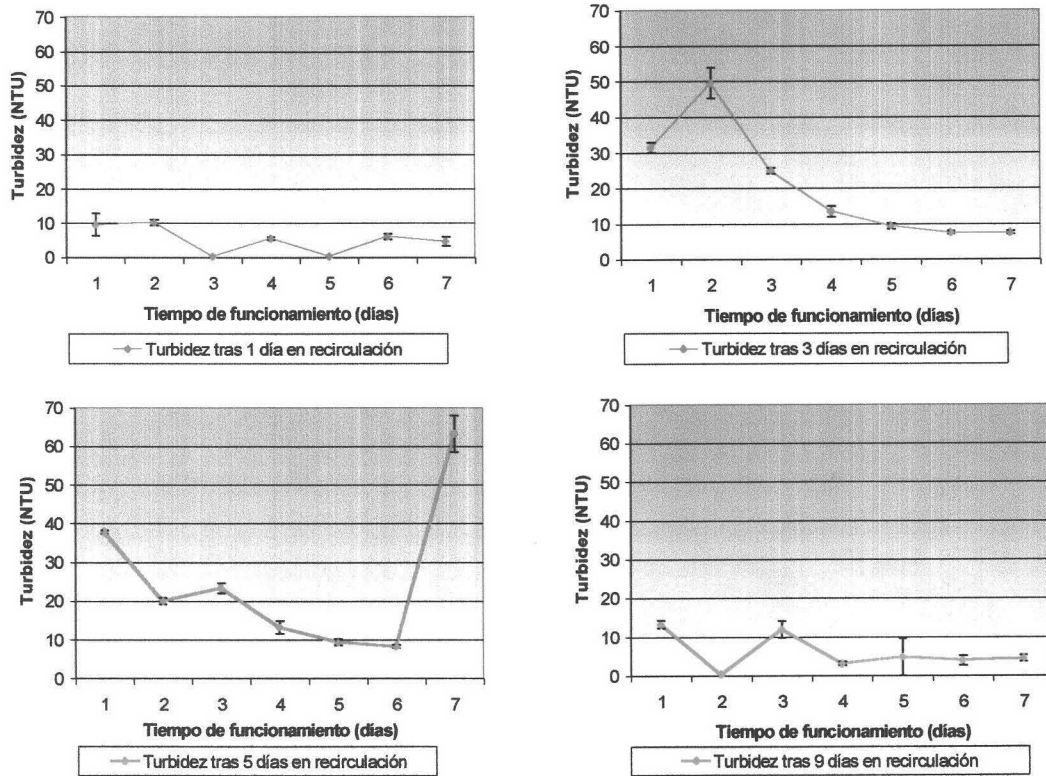


Fig. V.39. Turbidez en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación empleando licor mezcla como inoculante
(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Tabla V.14.- Análisis estadístico realizado para la turbidez en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados con licor mezcla como inoculante.

Análisis de varianza						
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia	
Días de funcionamiento	1	889,429	889,429	6,15	0,0153	
Días de recirculación	3	6410,0	2136,67	14,78	0,0000	
Total (corregido)	83	18723,0				
Test t de Student (P<0.05)						
Días de recirculación	Media	Grupo				
1 día	5,27	A				
3 días	20,53	B				
5 días	25,02	B				
9 días	5,93	A				

Al emplear licor mezcla como inoculante, se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en la turbidez del agua de salida tanto entre los días de funcionamiento como entre los días de recirculación, dándose los valores más altos para 3 y 5 días. Sin embargo, en el caso de *Ps. mendocina* no se apreciaron diferencias estadísticamente

significativas entre los días de recirculación, apreciándose esto tan solo frente a los días en funcionamiento.

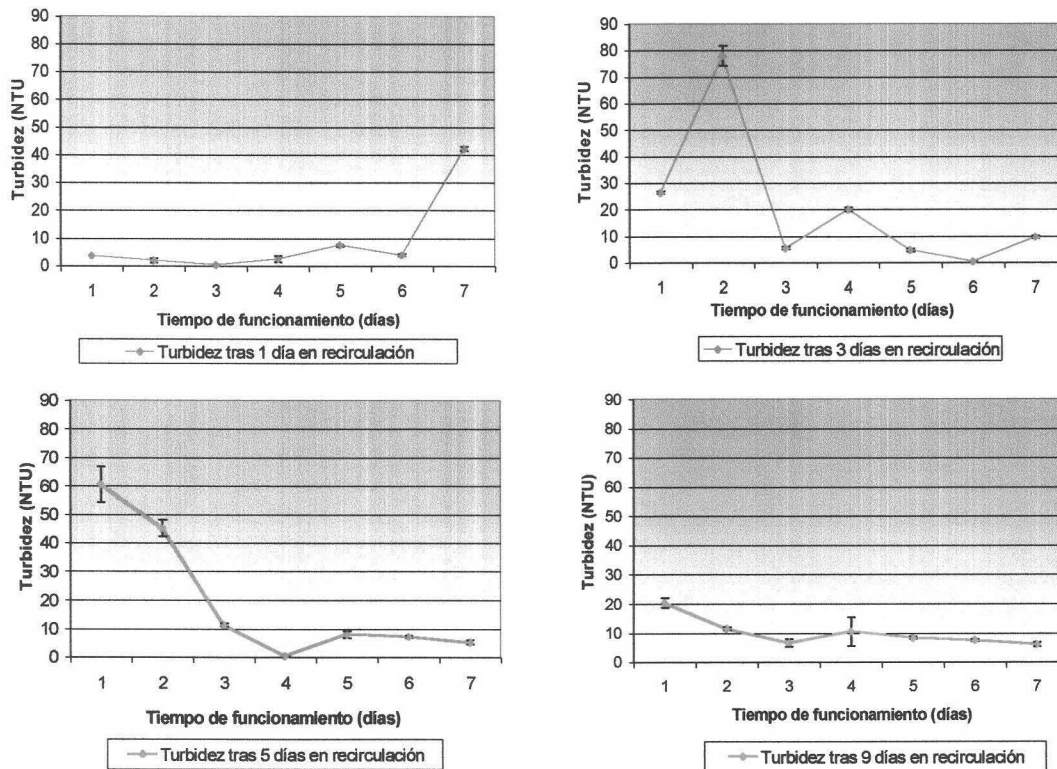


Fig. V.40. Turbidez en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación empleando *Pseudomonas mendocina* como inoculante
(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Tabla V.15.- Análisis estadístico realizado para la turbidez en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados con *Pseudomonas mendocina* como inoculante.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	3731,53	3731,53	12,47	0,0007
Días de recirculación	3	2412,08	804,03	2,69	0,0521
Total (corregido)	83	29784,3			

Test t de Student (P<0.05)		
Días de recirculación	Media	Grupo
1 día	8,86	A
3 días	20,65	A
5 días	19,63	A
9 días	10,11	A

- *Agrobacterium radiobacter*:

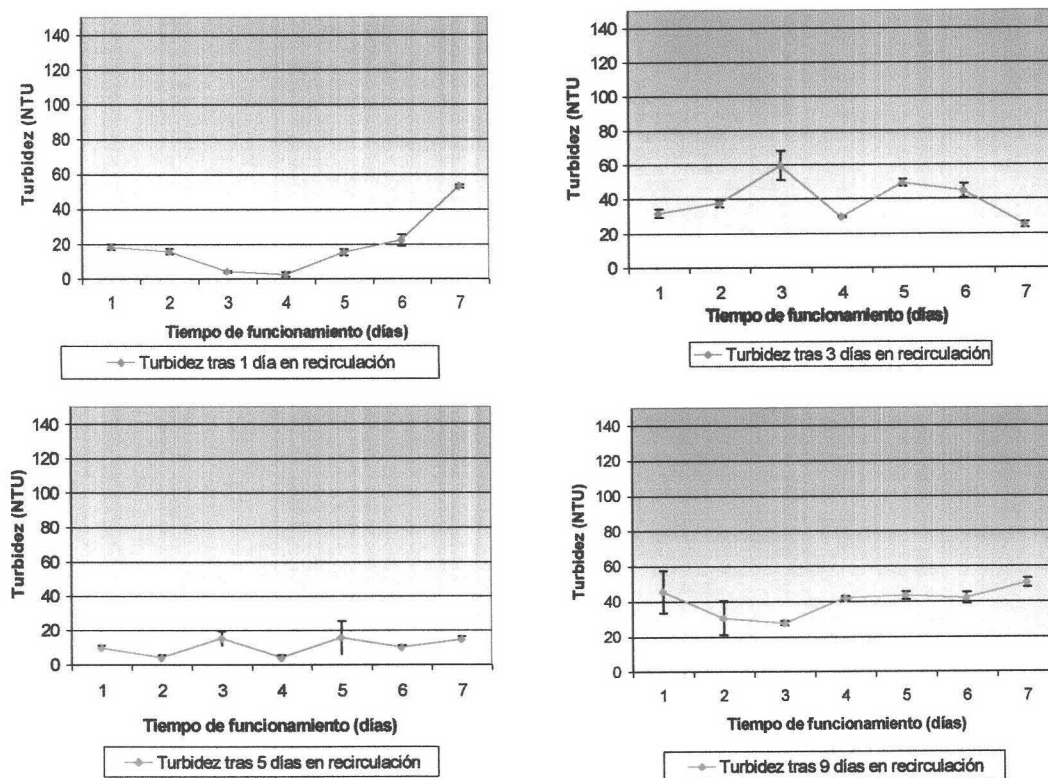


Fig. V.41. Turbidez en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación empleando *Agrobacterium radiobacter* como inoculante
(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Tabla V.16.- Análisis estadístico realizado para la turbidez en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados con *Agrobacterium radiobacter* como inoculante.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	729,71	729,71	6,67	0,0117
Días de recirculación	3	14714,9	4904,98	44,81	0,0000
Total (corregido)	83	24092,6			

Test t de Student (P<0.05)		
Días de recirculación	Media	Grupo
1 día	17,19	A
3 días	39,51	B
5 días	10,38	C
9 días	40,13	B

Cuando se empleó *Ag. radiobacter* como inoculante, la turbidez del agua tratada presentó los valores más altos de los tres inoculantes ensayados, existiendo diferencias estadísticamente significativas tanto entre los días de funcionamiento como entre los días de recirculación. El comportamiento para 3 y 9 días es homogéneo siendo en este grupo donde se dan los valores mayores de todos los ensayos realizados y para 5 días cuando se dan los valores menores.

Si representamos gráficamente el valor medio semanal de turbidez en el agua de salida para cada inoculante y para cada tiempo de recirculación ensayado, (figura V.42.) podemos apreciar como destaca en todos los casos los ensayos realizados con *Agrobacterium radiobacter*.

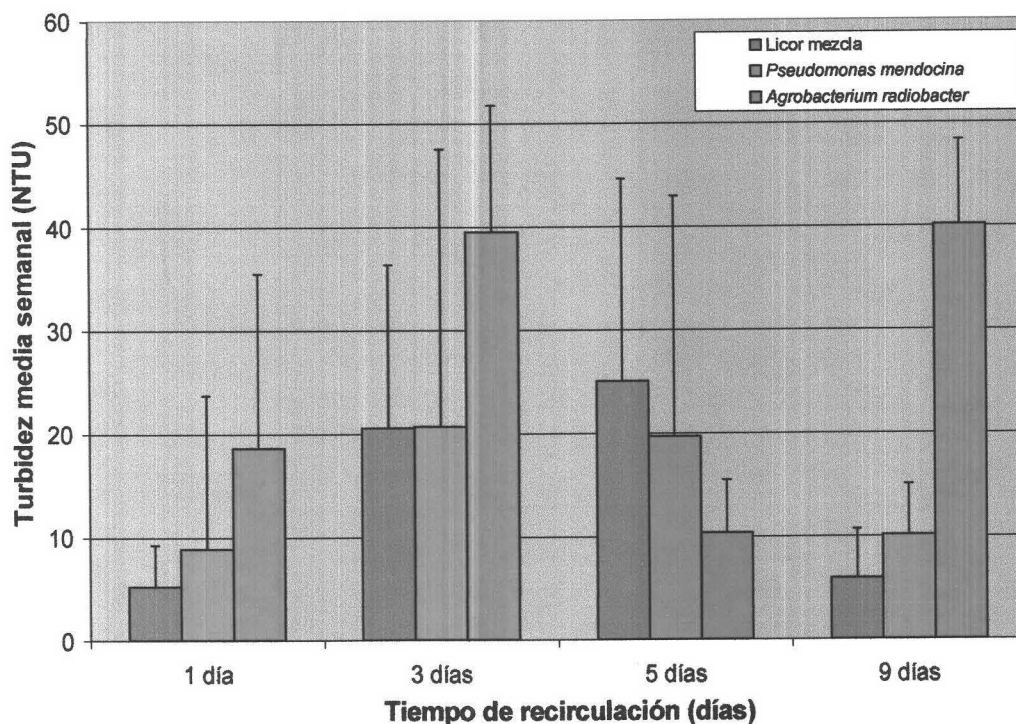


Fig. V.42. Turbidez media semanal en agua de salida para diferentes tiempos de recirculación y diferentes inoculantes

(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Los valores obtenidos en estos ensayos (medias por encima de 6 NTU) obligan a posteriores tratamientos del agua para adecuarla a las exigencias legislativas de potabilidad (R.D. 1136/90). Estos tratamientos deben ser más fuertes para los ensayos con *Ag. radiobacter*, sin embargo hay que tener en cuenta que los trabajos realizados a

escala de laboratorio solo son estimativos, precisando estudios a escala semi-técnica para determinar las necesidades reales en la corrección de esta característica organoléptica del agua.

Paralelo a los análisis de turbidez, se realizaron **recuentos de microorganismos totales en el agua de salida** una vez puesto en funcionamiento el sistema para los diferentes tiempos de recirculación y los diferentes inoculantes:

Tabla V.17.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados y los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de recirculación	1	$4,359 \times 10^{14}$	$4,359 \times 10^{14}$	2,17	0,1426
Inoculante	2	$1,701 \times 10^{15}$	$8,504 \times 10^{14}$	4,23	0,0161
Total (corregido)	167	$3,508 \times 10^{16}$			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
Licor mezcla	$1,02 \times 10^6$	A
<i>Ps. mendocina</i>	$5,71 \times 10^6$	B
<i>Ag. radiobacter</i>	$8,76 \times 10^6$	B

Existen diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de microorganismos en el agua de salida en función de los inoculantes ensayados, pero no entre los días de recirculación; *Ps. mendocina* y *Ag. radiobacter* son para los que se dan los resultados más altos, siendo éstos estadísticamente semejantes, mientras que para el caso del licor mezcla aparecieron en valores más bajos.

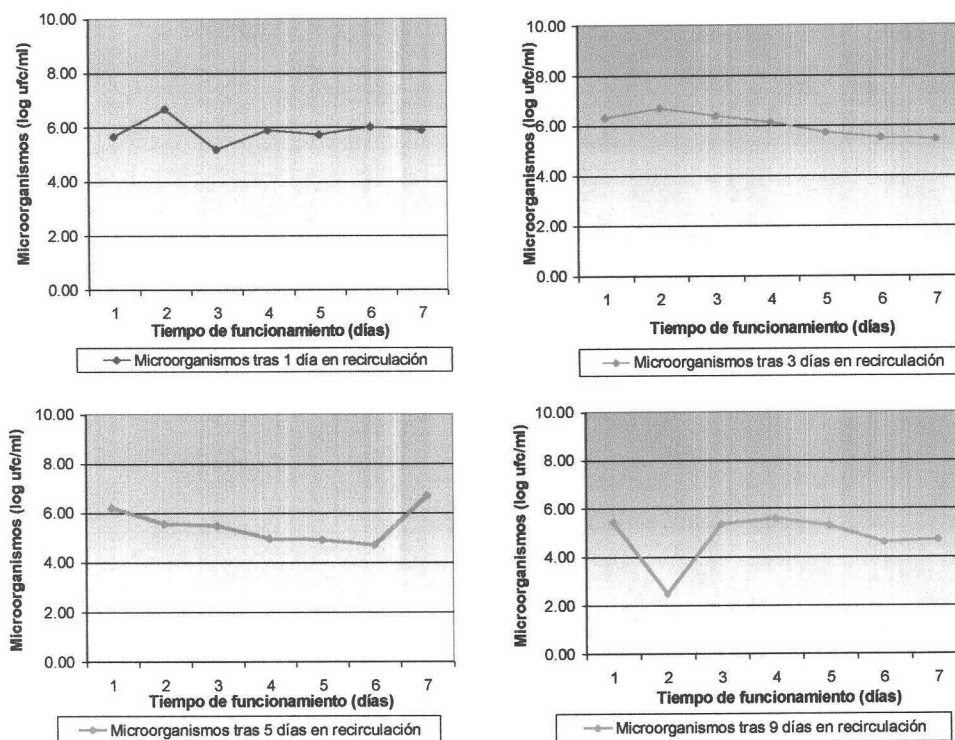


Fig. V.43. Microorganismos en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación empleando licor mezcla como inoculante

Tabla V.18.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados con licor mezcla como inoculante.

Análisis de varianza						
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia	
Días de funcionamiento	1	$3,261 \times 10^{12}$	$3,261 \times 10^{12}$	1,61	0,2097	
Días de recirculación	3	$1,667 \times 10^{13}$	$5,558 \times 10^{12}$	2,75	0,0521	
Total (corregido)	55	$1,230 \times 10^{14}$				

Test t de Student (P<0.05)		
Días de recirculación	Media	Grupo
1 día	$1,2 \times 10^6$	A
3 días	$1,7 \times 10^6$	A
5 días	$1,1 \times 10^6$	A
9 días	$1,6 \times 10^5$	B

Para los ensayos con licor mezcla como inoculante, no se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre los días de funcionamiento ni entre los días de recirculación. El comportamiento para 1, 3 y 5 días fue semejante, siendo en este grupo donde se dan los valores mayores. Para estos ensayos se apreció una menor turbidez en el agua de salida, así como una menor presencia de microorganismos precisándose a pesar de ello corregir ambos parámetros. Esta biopelícula destaca por su mayor estabilidad, justificada por su menor desprendimiento al medio, sin embargo mayor estabilidad no es sinónimo de mejor rendimiento, tal como se aprecia en los valores expuestos anteriormente.

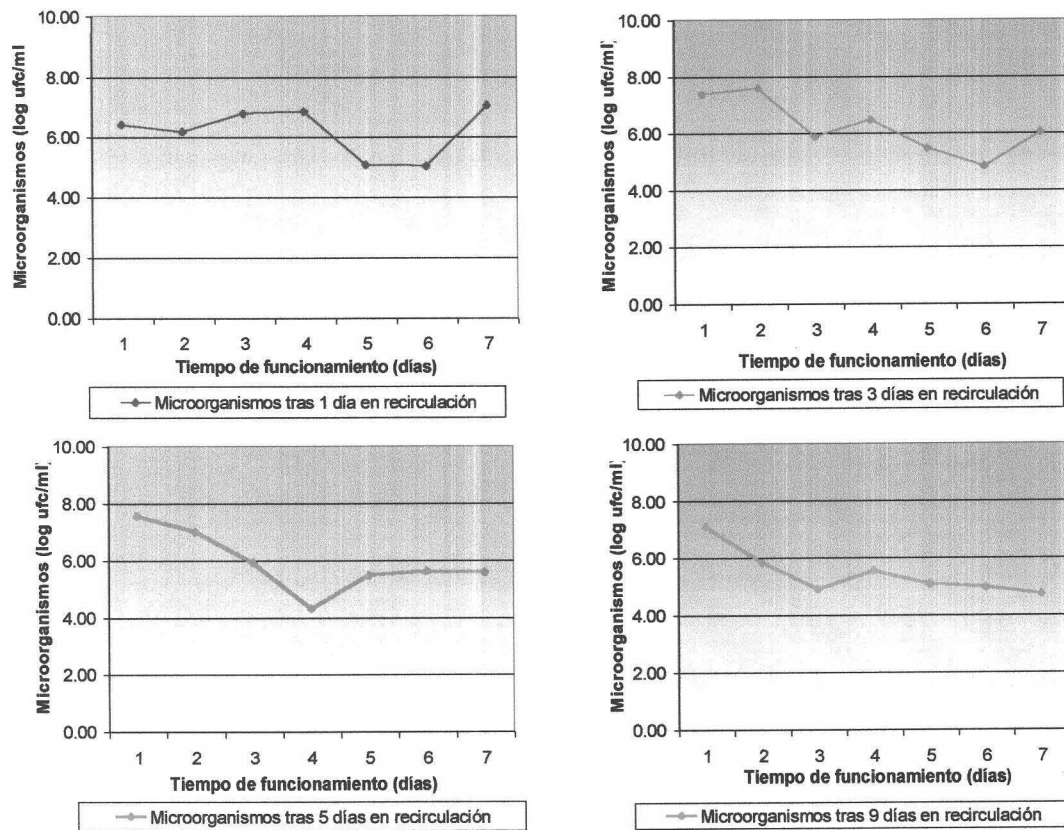


Fig. V.44. Microorganismos en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación empleando *Pseudomonas mendocina* como inoculante

Tabla V.19.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados con *Pseudomonas mendocina* como inoculante.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	$1,569 \cdot 10^{15}$	$1,569 \cdot 10^{15}$	19,82	0,0000
Días de recirculación	3	$5,048 \cdot 10^{14}$	$1,683 \cdot 10^{14}$	2,13	0,1085
Total (corregido)	55	$6,113 \cdot 10^{15}$			

Test t de Student (P<0.05)		
Días de recirculación	Media	Grupo
1 día	$4,1 \cdot 10^6$	A
3 días	$9,9 \cdot 10^6$	A
5 días	$6,8 \cdot 10^6$	A
9 días	$1,9 \cdot 10^6$	A

Si se emplea *Ps. mendocina* como inoculante, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los días de recirculación, siendo el comportamiento para los cuatro ensayos realizados homogéneo. Esto concuerda con los valores de turbidez, parámetro que está correlacionado con la presencia de microorganismos procedentes de la biopelícula.

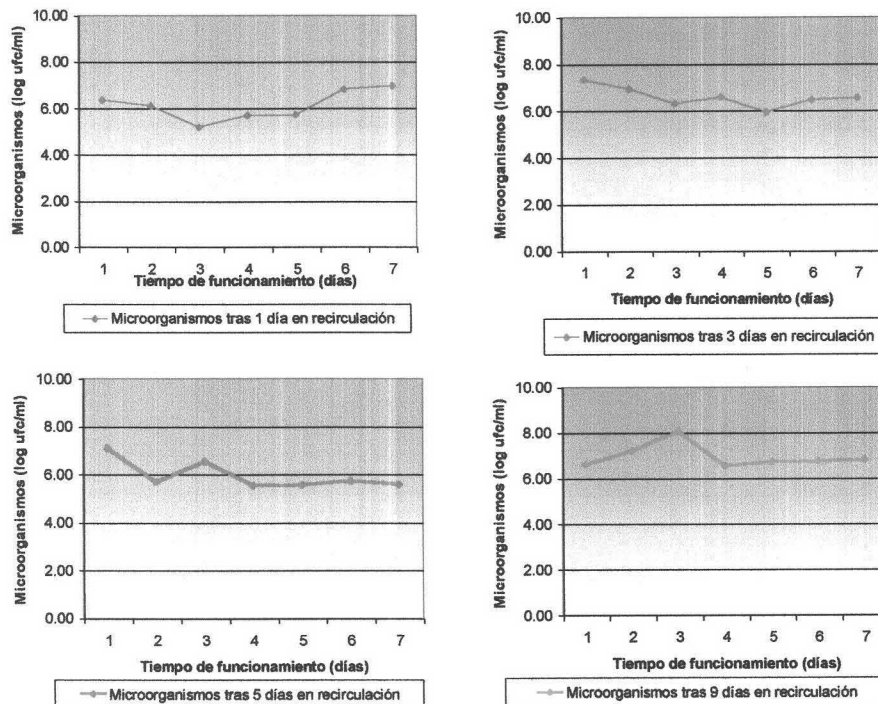


Fig. V.45. Microorganismos en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación empleando *Agrobacterium radiobacter* como inoculante

Tabla V.20.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados con *Agrobacterium radiobacter* como inoculante.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	$7,507 \times 10^{14}$	$7,507 \times 10^{14}$	1,71	0,1974
Días de recirculación	3	$3,954 \times 10^{15}$	$1,318 \times 10^{15}$	2,99	0,0392
Total (corregido)	55	$2,715 \times 10^{16}$			

Test t de Student (P<0.05)		
Días de recirculación	Media	Grupo
1 día	$3,0 \times 10^6$	A
3 días	$6,3 \times 10^6$	A
5 días	$2,6 \times 10^6$	A
9 días	$2,3 \times 10^7$	B

Si se emplea *Ag. radiobacter* como inoculante, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los días de funcionamiento pero sí entre los días de recirculación. El comportamiento para 1, 3 y 5 días es homogéneo, siendo para 9 días donde se dan los valores mayores. En este aspecto hay que destacar, al igual que para el rendimiento, una biopelícula menos estable aunque se aumente el tiempo de recirculación para este microorganismo.

Representando gráficamente el valor medio semanal de microorganismos totales en el agua de salida para cada inoculante y para cada tiempo de recirculación ensayado, se puede observar que a diferencia de lo que ocurría con la turbidez, no se aprecian diferencias significativas en el recuento medio de microorganismos en el agua de salida durante 7 días en funcionamiento en función del inoculante empleado para la formación de la biopelícula, aunque sí destacan los valores de las cepas inoculantes frente al licor mezcla.

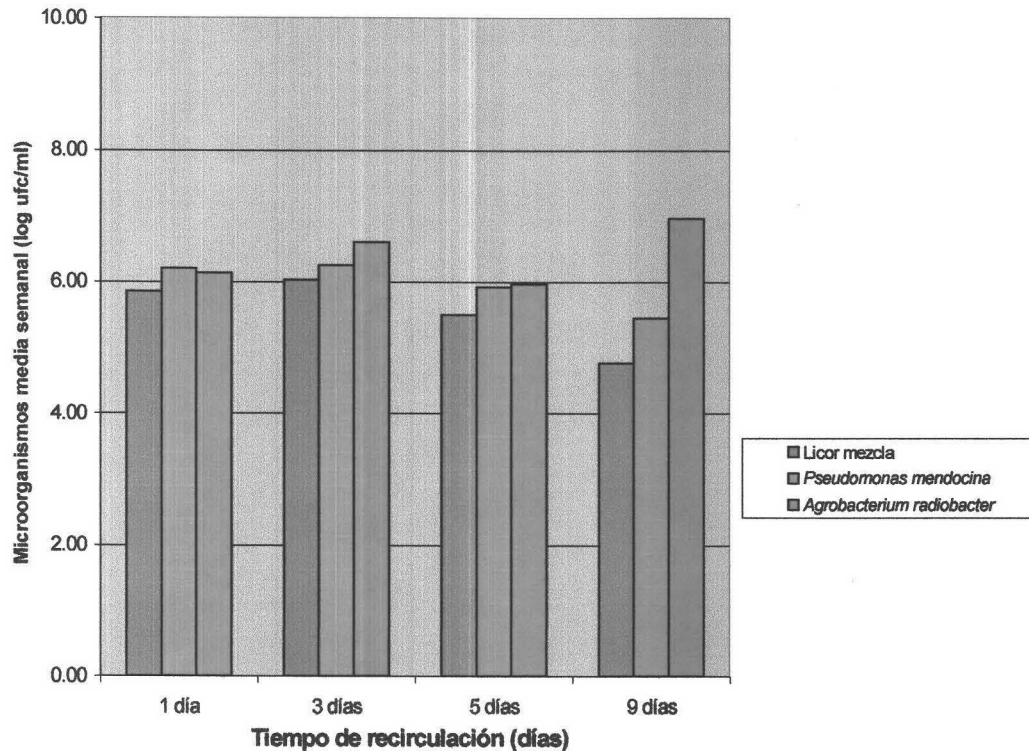


Fig. V.46. Microorganismos media semanal en agua de salida para diferentes tiempos de recirculación y diferentes inoculantes

La biopelícula formada con *Ag. radiobacter* ha demostrado ser muy efectiva en cuanto a la capacidad de eliminación de nitrógeno, pero probablemente condicionada por la mala adherencia de ésta, se desprende en mayor cuantía. Este aspecto negativo ha destacado en las biopelículas formadas mediante inoculación selectiva, no en el caso de licor mezcla. En este último caso, la presencia en la biopelícula de microorganismos con buena capacidad adherente (buena producción de EPS) sean o no desnitrificantes, dan una mayor resistencia del sistema al flujo del agua. Este aspecto está limitado para las dos especies bacterianas empleadas en la inoculación, las cuales presentan malas cualidades en la formación de EPS.

Esto quedó mostrado para *Ps. mendocina* al formar biopelículas que se desprendían, apreciándose un crecimiento negativo en la biopelícula. Para *Ag. radiobacter* el crecimiento fue positivo pero causado por un mayor crecimiento de la cepa en las condiciones de trabajo del biofiltro. Este crecimiento de biopelícula, que a su vez permite grandes rendimientos, se ve frenado por la poca adherencia de la cepa, lo que ocasiona incrementos en la concentración de microorganismos y turbidez en el agua tratada.

En el análisis realizado sobre el recuento de coliformes totales en el agua de salida una vez puesto en funcionamiento el sistema para los diferentes tiempos de recirculación y para los diferentes inoculantes, únicamente aparecieron resultados positivos en el caso de emplearse licor mezcla como inoculante. Los resultados obtenidos se reflejan en la figura V.47.

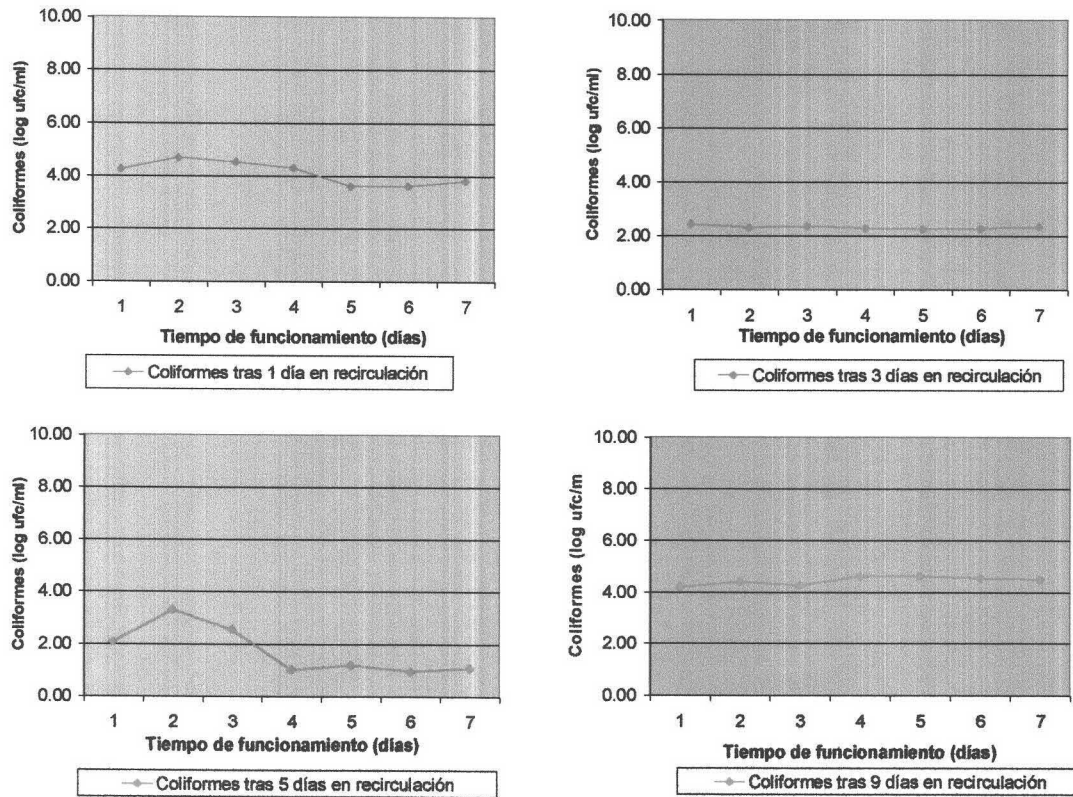


Fig. V.47. Coliformes totales en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación empleando licor mezcla como inoculante

Tabla V.21.- Análisis estadístico realizado para el recuento de coliformes en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados con licor mezcla como inoculante.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	$8,471 \cdot 10^7$	$8,471 \cdot 10^7$	0,91	0,3435
Días de recirculación	3	$8,608 \cdot 10^9$	$2,869 \cdot 10^9$	30,97	0,0000
Total (corregido)	55	$1,342 \cdot 10^{10}$			

Test t de Student (P<0.05)		
Días de recirculación	Media	Grupo
1 día	19068	A
3 días	215,4	B
5 días	358,1	B
9 días	29047	A

La presencia de coliformes en el licor mezcla (Bitton, 1994) condiciona la posible permanencia de éstos en la biopelícula, lo cual da lugar a la aparición de dichos indicadores en el agua tratada. Esto no sucedió en los ensayos realizados con inoculación selectiva, ya que la única posible presencia de estos microorganismos es a través del agua a tratar y el agua empleada en estos ensayos no contenía este tipo de microorganismos.

Este puede ser uno de los más importantes problemas de la aplicación de licor mezcla para la formación de la biopelícula, ya que si están presentes los coliformes también pueden estar diferentes patógenos tanto de origen bacteriano como de otros grupos fisiológicos (virus, protozoos, helmintos u hongos) los cuales suelen ser más resistentes a las condiciones ambientales (Calvo, *et al*, 1998). Esto obliga a realizar unos tratamientos de desinfección del agua más exhaustivos donde no sólo se controle la ausencia de bacterias patógenas sino también la del resto de posibles microorganismos patógenos.

V.4.3.- Conclusiones previas

Tras todos los ensayos realizados en esta segunda fase de la investigación, se llegó a las siguientes conclusiones:

- No se obtienen ventajas apreciables para tiempos de recirculación superiores a 1 día para formación de la biopelícula.
- El medio de cultivo empleado fue adecuado para el crecimiento de los inoculantes selectivos.
- La inoculación realizada con cultivo puro de *Agrobacterium radiobacter* permite obtener rendimientos óptimos desde el momento de la puesta en marcha del proceso sin aparición en el agua tratada de posibles microorganismos patógenos, tal como sucede en la inoculación con licor mezcla.

- El empleo de cultivo puro da lugar a biopelículas más homogéneas donde los microorganismos desnitrificantes son mayoritarios, por lo que la efectividad del proceso es mayor.
- Los valores de microorganismos y de turbidez en el agua de salida hacen pensar que la biopelícula obtenida a partir de inoculación selectiva es poco estable. Esto afecta a las características finales del efluente, siendo necesario aplicar tratamientos posteriores para potabilizar el agua.

V.5.- 3ª FASE DE LA INVESTIGACIÓN A ESCALA DE LABORATORIO

Dado que en la fase anterior de la investigación se comprobó que la inoculación selectiva presentaba ventajas frente a la inoculación con cultivo heterogéneo de alta densidad bacteriana (licor mezcla), se decidió continuar la investigación realizando la inoculación selectiva con otras cepas manteniéndolas en esta fase únicamente 1 día en recirculación, ya que en las fases anteriores se preció que en la mayoría de los casos el tiempo de recirculación superior a 24 horas no favorecía la estabilidad de la biopelícula.

Las condiciones de trabajo anteriores se mantuvieron en cuanto a medio de cultivo empleado para crecimiento de los microorganismos, carga hidráulica de $2 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$, eliminación del oxígeno disuelto presente en el agua a tratar y adición de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ hasta obtener una concentración constante en el agua a tratar de 0,6 mg/l de fósforo.

V.5.1.- Variables y parámetros de la 3ª fase de la investigación de choque.

En cuanto a las **VARIABLES** que se controlaron en el proceso, dado que en la fase anterior no se encontraron mejoras apreciables en la utilización de más de 1 día de recirculación para formación de la biopelícula, se elimina dicha variable en esta fase, considerando únicamente 1 día de recirculación para comparar diferentes cepas en el proceso de inoculación selectiva. Por tanto, la única variable que se consideró en esta fase fue:

- **Empleo de diferentes inoculantes para formación de la biopelícula.** El empleo de nuevas cepas para estudiar el proceso de inoculación selectiva trataba de buscar mejoras en la formación de la biopelícula y por lo tanto en el rendimiento y estabilidad del sistema, empleando cepas procedentes todas ellas de biopelículas desnitrificantes formadas a partir de la inoculación con licor mezcla. La selección de los inoculantes se realizó considerando la actividad desnitrificante de la cepa y su capacidad para desarrollar biopelículas (producción de EPS). En función de estas

características se seleccionaron tres nuevas cepas comparando el funcionamiento del sistema con los ensayos realizados en la fase anterior para 24 horas de recirculación. Estas cepas fueron:

- a) *Pseudomonas alcaligenes*: cepa con alta actividad desnitrificante aislada de biopelículas desnitrificantes que trabajaban en presencia de oxígeno disuelto. Presenta gran capacidad para crecer en medios de cultivo ricos en nutrientes (medio empleado en la inoculación) no afectándole el oxígeno presente en el medio para el posterior desarrollo de la actividad desnitrificante.
- b) *Pseudomonas pickettii*: cepa con alta actividad desnitrificante, con iguales características que las anteriores, pero aislada de biopelículas desnitrificantes que trabajaban en presencia de etanol. Utiliza como fuente de carbono etanol.
- c) *Pseudomonas fluorescens*: cepa aislada de la misma biopelícula que *Ps. pickettii*, pero que en medios de cultivo ricos en nutrientes es capaz de desarrollar gran cantidad de EPS (Fig. V.48.).

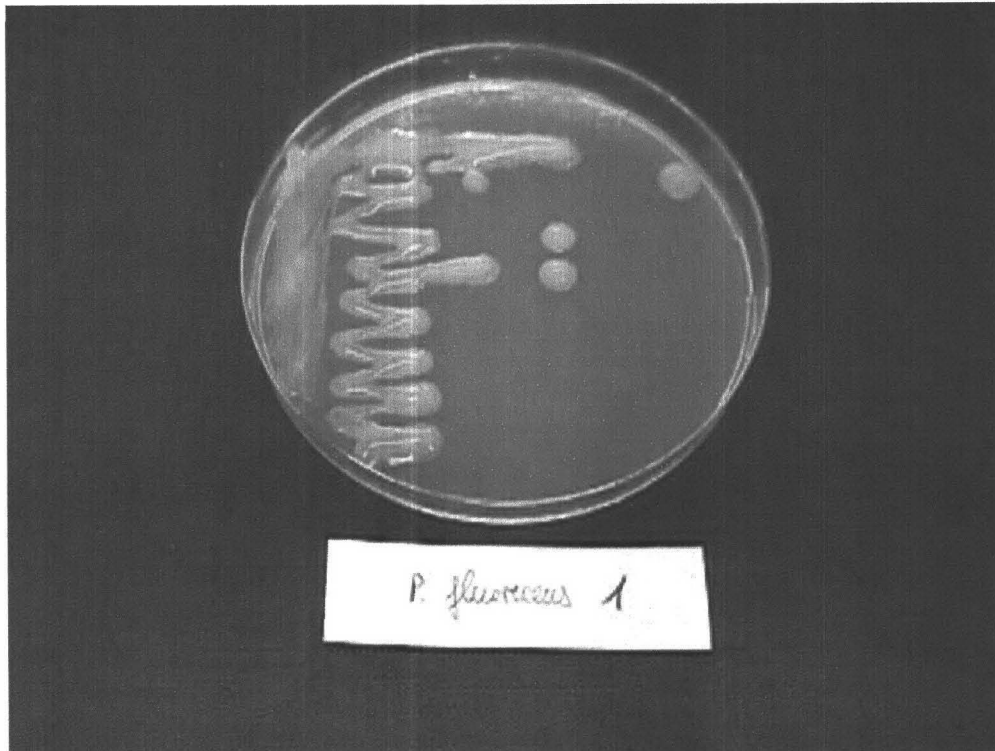


Fig.V.48. Siembra de la cepa *Ps. fluorescens* en medio de cultivo rico en nutrientes.

Los **PARÁMETROS** que se controlaron en el proceso, tanto sobre el relleno como sobre el agua, fueron los mismos que los indicados en el apartado V.4.1 para la fase anterior de la investigación de choque.

- Los parámetros que se controlaron **sobre las muestras de relleno** se analizaron tras finalizar el periodo de recirculación de 1 día, y tras finalizar el funcionamiento de la planta para cada uno de los inoculantes empleados para formación de la biopelícula. Para cada ensayo, la planta se mantuvo en funcionamiento durante 7 días. Tras conocer el proceso de formación de biopelícula en las fases anteriores, se decidió prescindir de la microscopía de barrido de superficie para conocer la existencia de ésta.
- Los parámetros que se controlaron **sobre las muestras de agua** se analizaron diariamente a lo largo de la fase del funcionamiento del sistema, para cada uno de los inoculantes empleados en la recirculación.

V.5.2.- Resultados previos de la 3ª fase

El crecimiento bacteriano obtenido en el medio de cultivo para cada uno de los nuevos inoculantes empleados, puestos en agitador orbital a 30 °C y durante 48 horas, fue el siguiente:

- *Pseudomonas alcaligenes*: $3,4 \cdot 10^7$ ufc/ml
- *Pseudomonas pickettii*: $1,5 \cdot 10^8$ ufc/ml
- *Pseudomonas fluorescens*: $8 \cdot 10^8$ ufc/ml

La mayor densidad bacteriana se presentó para el cultivo de *Ps. fluorescens*, sin embargo el valor alcanzado fue muy inferior al contenido para el licor mezcla según se indicó en la 2ª fase.

V.5.2.1.- Resultados sobre las muestras de relleno

Comparando los valores medios obtenidos de la **actividad desnitrificante** tras 1 día en recirculación para cada una de las cepas empleadas en el proceso de inoculación, se obtuvieron los siguientes resultados:

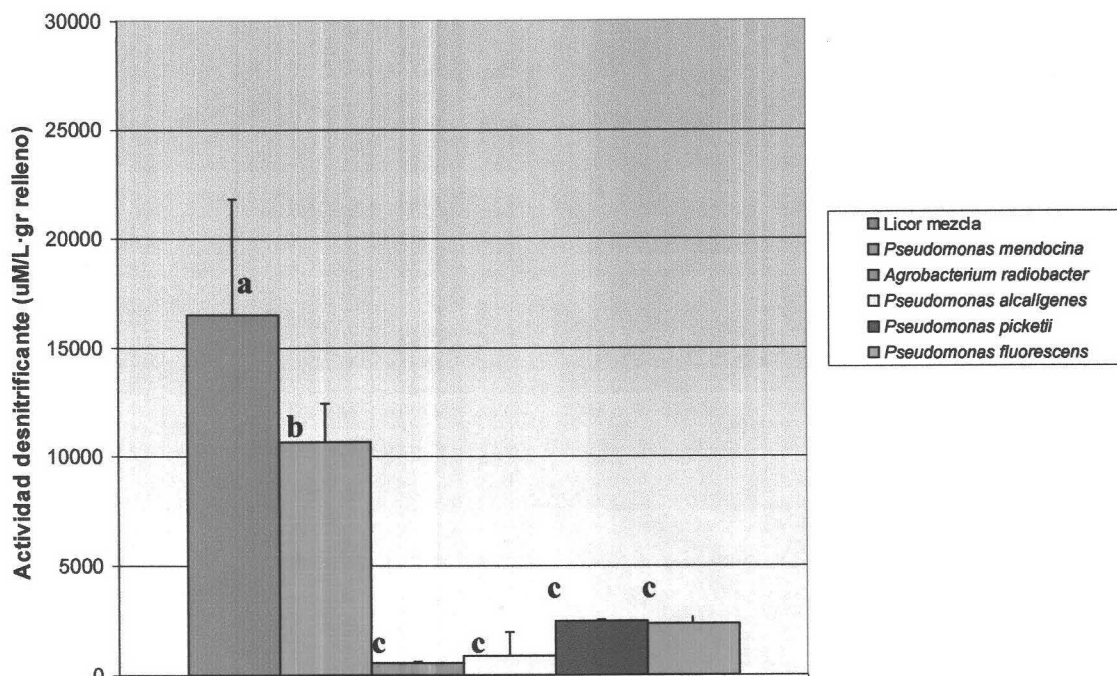


Fig.V.49. Actividad desnitrificante tras la recirculación para diferentes cepas.

(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

(a) Existen diferencias estadísticamente significativas entre grupos con diferente letra.

Tabla V.22.- Análisis estadístico realizado para la actividad desnitrificante en el relleno tras la recirculación para los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Inoculante	5	$4,248 \cdot 10^8$	$8,496 \cdot 10^7$	15,67	0,0022
Total (corregido)	11	$4,573 \cdot 10^8$			

Como puede comprobarse existen diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$) para la actividad desnitrificante tras la recirculación entre los diferentes inoculantes empleados. La mayor actividad desnitrificante se obtiene para el caso de

emplear licor mezcla, siendo *Pseudomonas mendocina* la que mayor actividad tiene entre las cepas empleadas para la inoculación selectiva.

Comparando los valores medios obtenidos de la **actividad desnitrificante** tras el funcionamiento para cada una de las cepas empleadas en el proceso de inoculación, se obtuvieron los siguientes resultados:

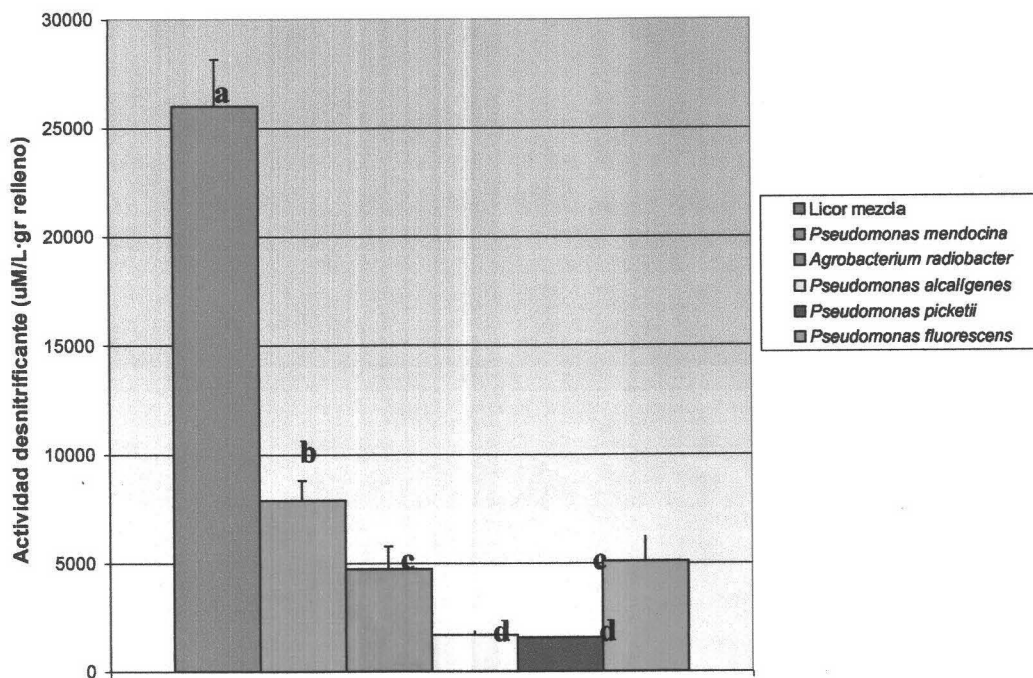


Fig.V.50. Actividad desnitrificante tras el funcionamiento para diferentes cepas.

(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

(a) Existen diferencias estadísticamente significativas entre grupos con diferente letra.

Tabla V.23.- Análisis estadístico realizado para la actividad desnitrificante en el relleno tras el funcionamiento para los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Inoculante	5	$8,509 \cdot 10^8$	$1,702 \cdot 10^8$	132,17	0,0000
Total (corregido)	11	$8,586 \cdot 10^8$			

Como puede comprobarse existen diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$) para la actividad desnitrificante tras el funcionamiento entre los diferentes inoculantes empleados, siendo también para el licor mezcla para el que se obtiene mayor actividad seguido de *Ps. mendocina*. En el caso de emplear *Agrobacterium radiobacter*, la actividad sufrió un importante incremento transcurridos los siete días que se mantuvo la planta funcionando, presentando un comportamiento semejante la cepa *Ps. fluorescens*. Tanto *Ps. picketii* como *Ps. alcaligenes* presentaron los peores resultados tras el funcionamiento aunque incrementaron su actividad media.

Comparando los valores medios obtenidos en el **recuento de microorganismos** tras 1 día en recirculación para cada una de las cepas empleadas en el proceso de inoculación, se obtuvieron los resultados mostrados en la figura V.51.

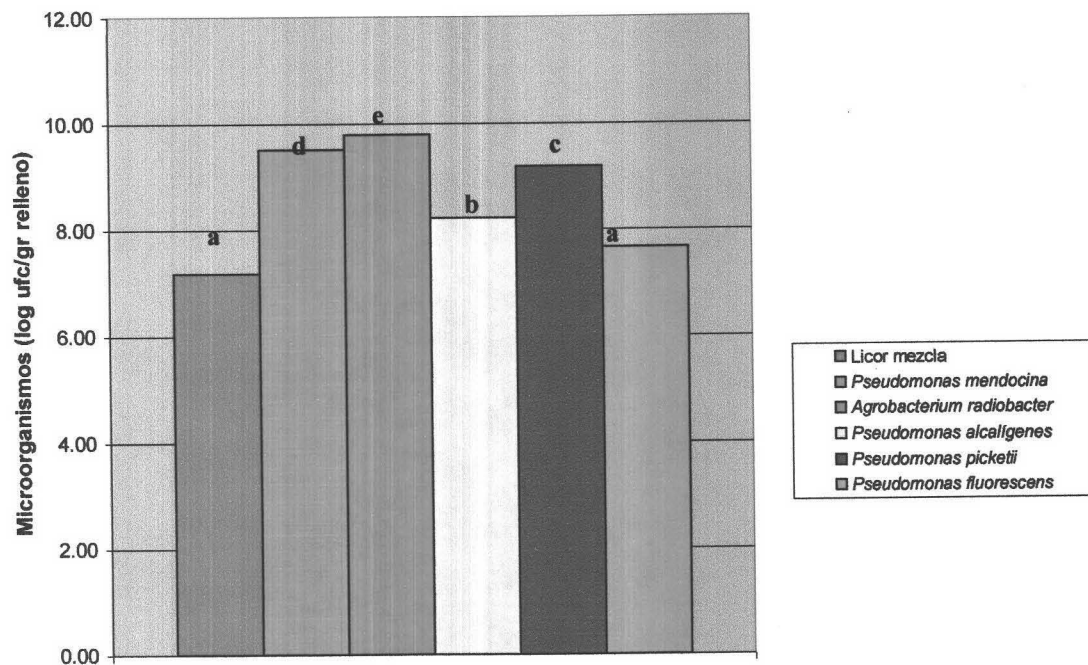


Fig.V.51. Recuentos microorganismos en el relleno tras la recirculación para diferentes cepas

(a) Existen diferencias estadísticamente significativas entre grupos con diferente letra.

Tabla V.24.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el relleno tras la recirculación para los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Inoculante	5	$5,919 \cdot 10^{19}$	$1,184 \cdot 10^{19}$	10600,20	0,0000
Total (corregido)	11	$5,920 \cdot 10^{19}$			

Como puede comprobarse existen diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$) para el recuento de microorganismos en el relleno tras la recirculación entre los diferentes inoculantes empleados. El mayor número de microorganismos en el relleno fue observado en los ensayos con *Agrobacterium radiobacter*.

Comparando los valores medios obtenidos en el **recuento de microorganismos** tras el funcionamiento para cada una de las cepas empleadas en el proceso de inoculación, se obtuvieron los siguientes resultados:

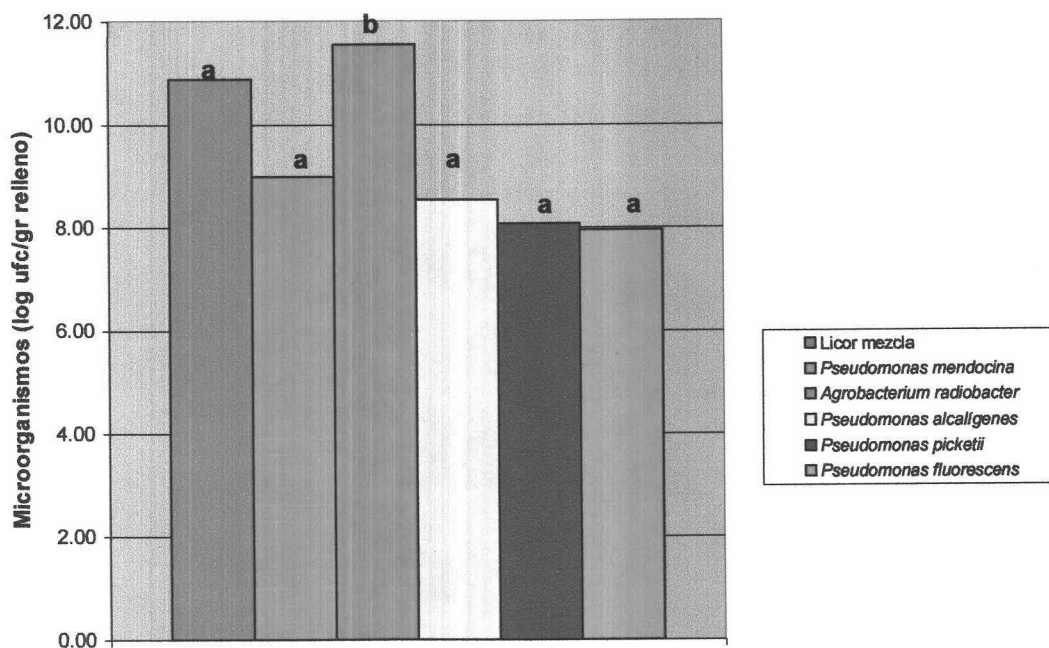


Fig.V.52. Recuentos microorganismos en el relleno tras el funcionamiento para diferentes cepas

(a) Existen diferencias estadísticamente significativas entre grupos con diferente letra.

Tabla V.25.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el relleno tras el funcionamiento para los diferentes inoculantes empleados.

Fuente de variación	g.l.	Análisis de varianza			Nivel de significancia
		Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	
Inoculante	5	$2,013 \cdot 10^{23}$	$4,025 \cdot 10^{22}$	10,10	0,0069
Total (corregido)	11	$2,252 \cdot 10^{23}$			

Como puede comprobarse existen diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$) para el recuento de microorganismos en el relleno tras el funcionamiento entre los diferentes inoculantes empleados. Todos los inoculantes empleados se agrupaban en un grupo homogéneo, excepto *Ag. radiobacter* que es para el que se observó mayor número de microorganismos, siendo también el que sufre un mayor incremento tras el funcionamiento de 7 días. Esto fue indicativo de que la biopelícula formada con este inoculante fue más estable tras 24 horas de recirculación, lo cual se observó también en el caso de emplear licor mezcla y *Ps. alcaligenes*. El resto de biopelículas ensayadas sufrieron un descenso en el número de microorganismos tras el tiempo de funcionamiento, indicativo de la menor adherencia de ésta al sistema.

Ninguno de los tres inoculantes presentó ventajas destacables frente a los ensayos realizados en la 2ª fase, destacando *Ag. radiobacter* en cuanto a número de microorganismos en la biopelícula a pesar de su baja actividad desnitrificante. De las tres nuevas cepas desnitrificantes ensayadas, destacó *Ps. fluorescens* por su mayor incremento en la actividad desnitrificante, no apreciándose diferencias en el número de microorganismos entre esta cepa y las otras a pesar de la mayor formación de EPS que la caracteriza. Esto contradice la relación manifestada entre la formación de EPS y facilidad para colonizar una superficie observada por otros autores (Costerton, *et al*, 1987). La adherencia puede en todo caso estar condicionada no solo por la mayor o menor producción de EPS sino también por su composición (Jahn, *et al*, 1996).

V.5.2.2.- Resultados sobre las muestras de agua

Con el análisis realizado de la concentración de nitrato y nitrito en el agua de salida se obtiene el valor de **nitrógeno total diario** una vez puesto en funcionamiento el sistema para los diferentes inoculantes, obteniéndose los siguientes resultados:

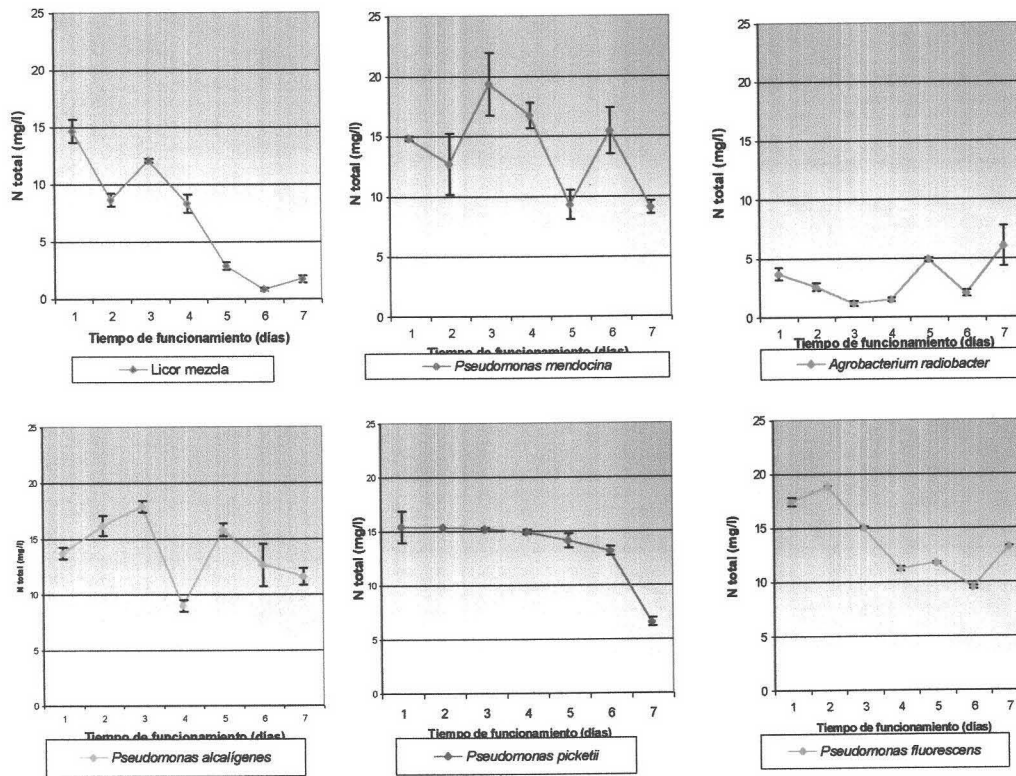


Fig. V.53. Nitrógeno total diario en el agua de salida para diferentes cepas. (Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Únicamente en el caso de emplear *Agrobacterium radiobacter* en el proceso de formación de la biopelícula se obtienen valores inferiores al máximo permitido por la legislación (11 mg de N/l) desde el primer día de la puesta en funcionamiento del sistema.

Representando el valor medio semanal del rendimiento en eliminación de nitrógeno total para cada uno de los inoculantes ensayados se obtiene la siguiente figura:

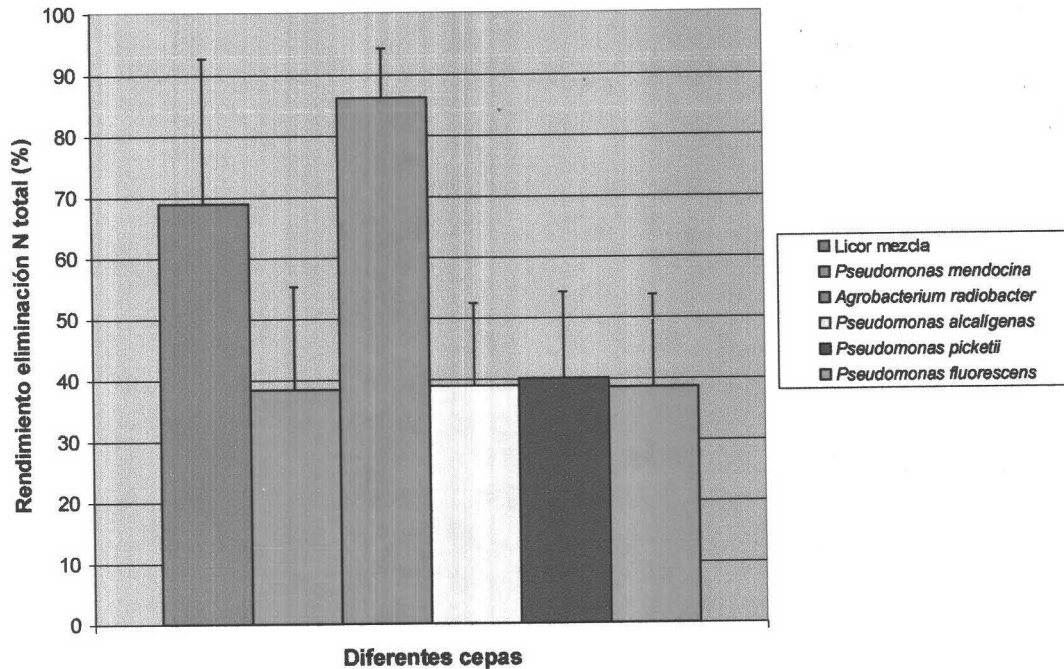


Fig. V.54. Rendimiento medio semanal en eliminación de N total
(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Tabla V.26.- Análisis estadístico realizado para la concentración de nitrógeno total en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 días.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	442,924	442,924	51,79	0,0000
Inoculante	5	2281,24	456,248	53,35	0,0000
Total (corregido)	125	3741,87			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
Licor mezcla	7,007	A
<i>Ps. mendocina</i>	13,89	B
<i>Ag. radiobacter</i>	3,128	C
<i>Ps. alcaligenes</i>	13,80	B
<i>Ps. picketii</i>	13,53	B
<i>Ps. fluorescens</i>	13,86	B

Como puede comprobarse con el análisis estadístico realizado, existen diferencias estadísticamente significativas para el nitrógeno total en el agua de salida entre los inoculantes y entre los días de funcionamiento, siendo el que mejor resultados presenta el *Ag. radiobacter*, seguido del licor mezcla. El resto de inoculantes pertenecen a un mismo grupo de comportamiento.

En el ensayo realizado con *Ag. radiobacter* como inoculante podemos apreciar que desde el inicio en la aplicación de flujo de agua para tratar se consigue una reducción de nitrógeno total acorde con las exigencias legislativas, alcanzando un rendimiento medio de 86,14%, mientras que para el resto de inoculantes selectivos el valor medio de nitrógeno total en el agua tratada fue de 13,8 mg/l (39% de rendimiento).

Estos rendimientos chocan con los valores de actividad desnitrificante manifestada por el material de relleno inoculado; únicamente la estabilidad mostrada por la biopelícula de *Ag. radiobacter* permite una alta eficacia en reducción desasimilatoria de nitrato, efecto no logrado para el resto de inoculaciones por su baja estabilidad (desprendimiento de la biopelícula por el flujo del agua). Esta alta estabilidad fue observada igualmente en los ensayos con licor mezcla, apreciándose también un alto rendimiento (69%).

En el análisis realizado sobre la **concentración diaria de nitrito en el agua de salida** una vez puesto en funcionamiento el sistema para los diferentes inoculantes, se obtuvieron los siguientes resultados:

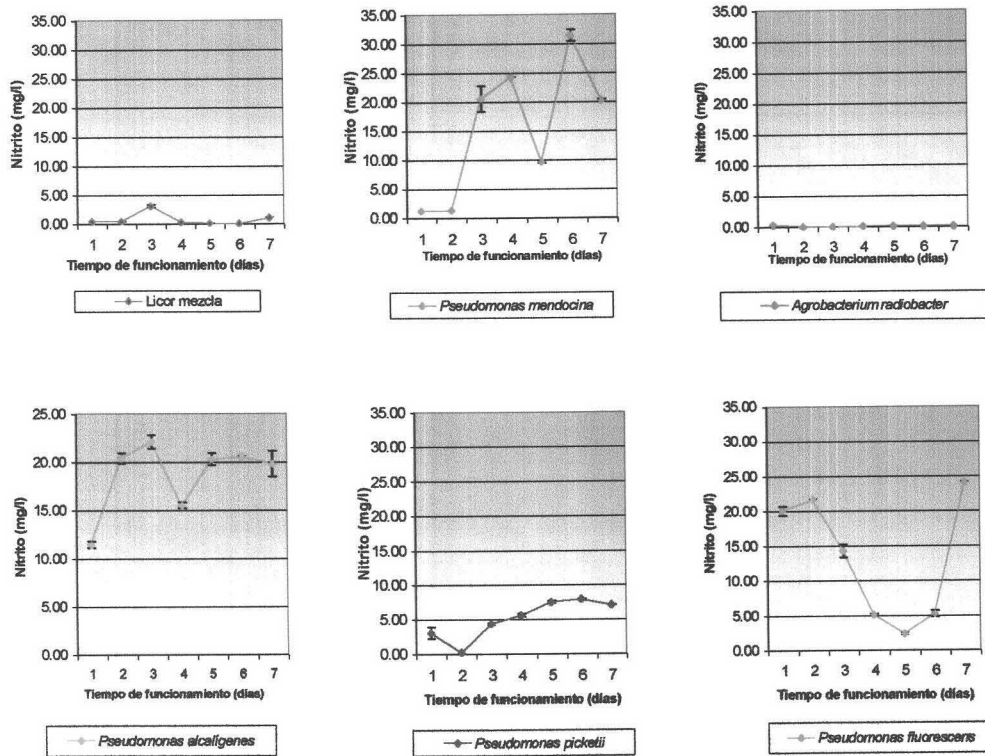


Fig. V.55. Concentración de nitrito diaria en el agua de salida para diferentes cepas. (Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Tabla V.27.- Análisis estadístico realizado para la concentración de nitrito en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 días.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	284,867	284,867	8,35	0,0046
Inoculante	5	6638,38	1327,68	38,93	0,0000
Total (corregido)	125	10982,1			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
Licor mezcla	0,721	A
<i>Ps. mendocina</i>	15,53	C
<i>Ag. radiobacter</i>	0,083	A
<i>Ps. alcaligenes</i>	18,59	C
<i>Ps. picketii</i>	5,084	B
<i>Ps. fluorescens</i>	13,25	C

Como puede comprobarse con el análisis estadístico realizado, existen diferencias estadísticamente significativas para el nitrito en el agua de salida entre los inoculantes y entre los días de funcionamiento, siendo licor mezcla y *Ag. radiobacter* los que mejores resultados presentaron, estando en ambos casos prácticamente siempre el valor por debajo del máximo permitido por la legislación (0,1 mg/l).

Lazarova, *et al* (1994) pusieron de manifiesto la importancia de la selección del inóculo en la acumulación de nitrito en el agua tratada. La presencia de este anión puede deberse a desequilibrios entre la densidad de bacterias desnitrificantes y reductoras de nitrito (Wilderer, *et al*, 1987), cosa que tan solo es posible en los ensayos con licor mezcla, o bien al tipo de microorganismos desnitrificantes, los cuales presentan diferente comportamiento enzimático frente al nitrito. En este sentido existen bacterias desnitrificantes que acumulan nitrito, apareciendo éste en el agua tratada, o bien otros que lo transforman directamente a N_2 evitando la acumulación (Blaszczyk, 1992). Este diferente comportamiento se puso de manifiesto entre los inoculantes ensayados presentando problemas el uso de *Ps. mendocina*, *Ps. alcaligenes* y *Ps. fluorescens*.

En el análisis realizado de la **turbidez en el agua de salida** una vez puesto en funcionamiento el sistema para los diferentes inoculantes, se obtuvieron los siguientes resultados:

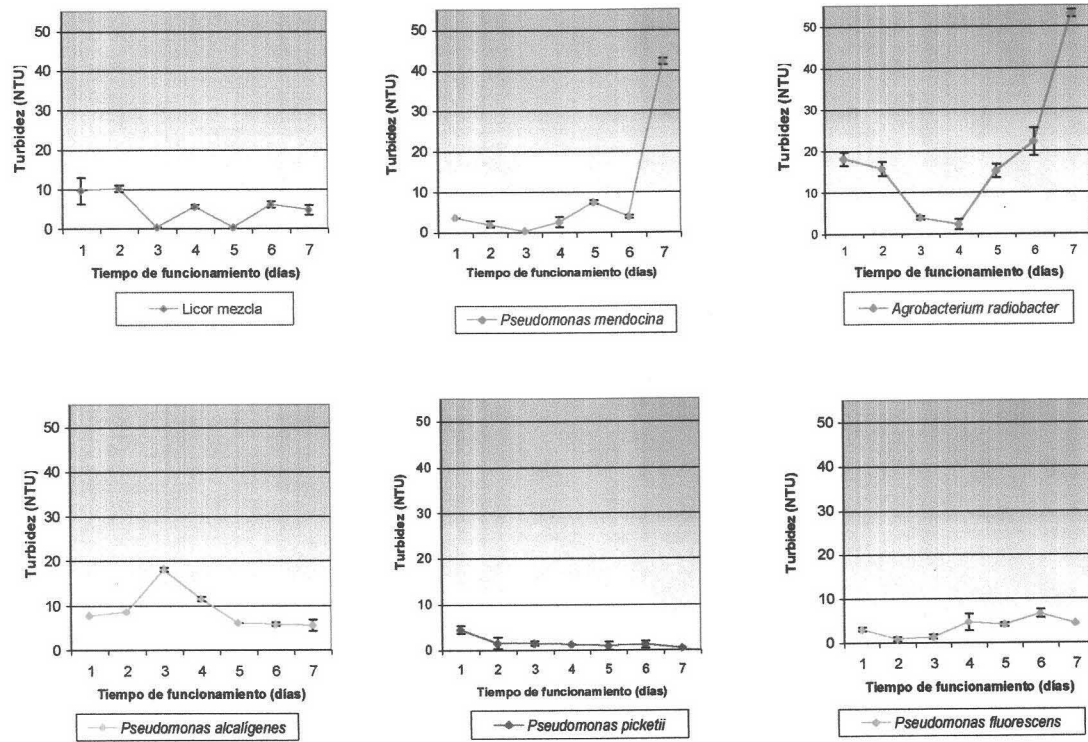


Fig. V.56. Valor diario de la turbidez en el agua de salida para diferentes cepas. (Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Tabla V.28.- Análisis estadístico realizado para la turbidez diaria en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 días.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	815,062	815,062	10,64	0,0014
Inoculante	5	3832,27	766,454	10,00	0,0000
Total (corregido)	125	13765,8			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
Licor mezcla	5,27	A
<i>Ps. mendocina</i>	8,86	A
<i>Ag. radiobacter</i>	18,62	B
<i>Ps. alcalígenes</i>	9,06	A
<i>Ps. picketii</i>	1,56	A
<i>Ps. fluorescens</i>	3,63	A

Los tres nuevos inoculantes empleados incrementaban los valores de turbidez del agua tratada ligeramente sobre las exigencias legislativas, presentando un comportamiento semejante a *Ps. mendocina*. Todos ellos destacaron bajo el valor de *Ag. radiobacter* que se presentó como el más desfavorable.

En el análisis realizado del **recuento de microorganismos totales en el agua de salida** una vez puesto en funcionamiento el sistema para los diferentes inoculantes, se obtuvieron los resultados mostrados en la figura V.57.

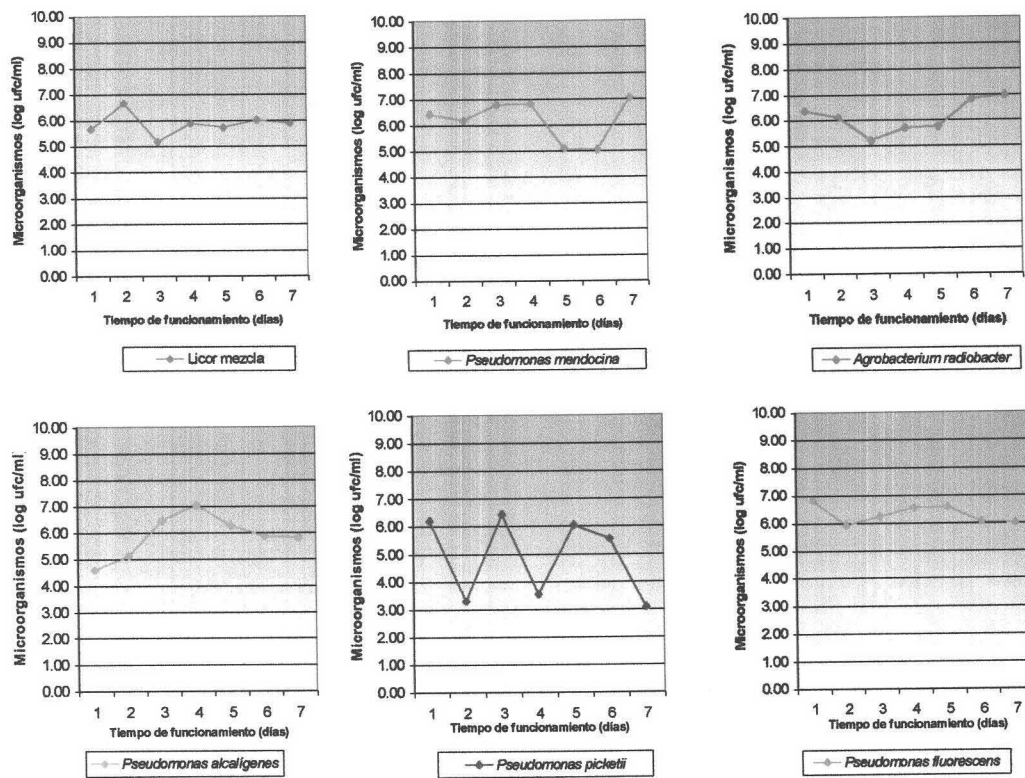


Fig. V.57. Recuento de microorganismos diario en el agua de salida para diferentes cepas.

Representando gráficamente el valor medio semanal de microorganismos totales en el agua de salida para cada inoculante ensayado, se obtiene el siguiente resultado:

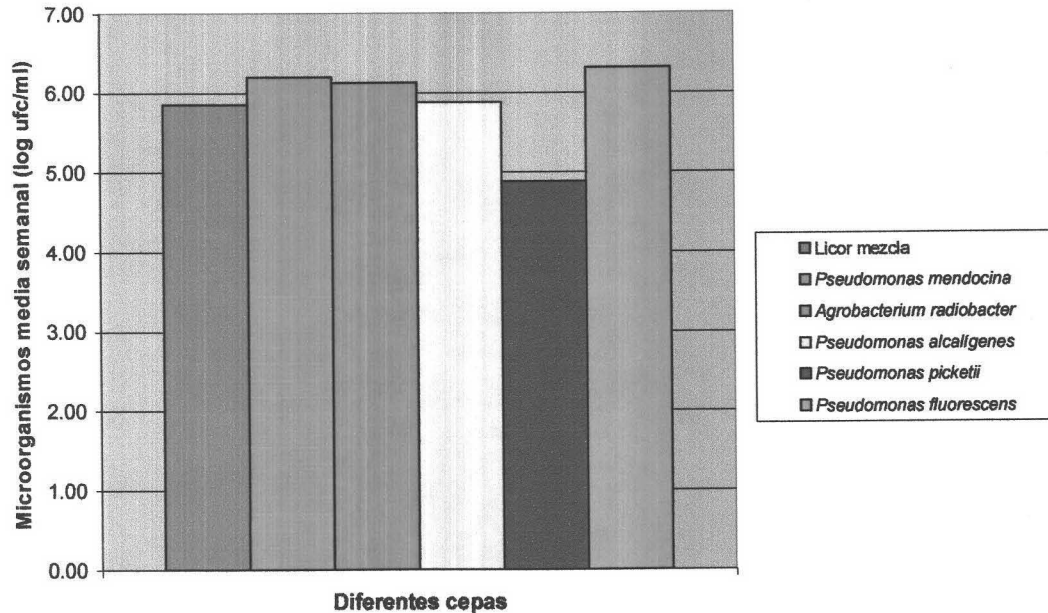


Fig. V.58. Recuento medio de microorganismos semanal en agua de salida para diferentes cepas.

Tabla V.29.- Análisis estadístico realizado para el recuento diario de microorganismos en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 días.

Fuente de variación	g.l.	Análisis de varianza		F-calculada	Nivel de significancia
		Suma de los cuadrados	Cuadrado medio		
Días de funcionamiento	1	$7,509 \cdot 10^{12}$	$7,509 \cdot 10^{12}$	0,86	0,3560
Inoculante	5	$1,097 \cdot 10^{14}$	$2,194 \cdot 10^{13}$	2,52	0,0563
Total (corregido)	83	$7,886 \cdot 10^{14}$			

Inoculante	Test t de Student (P<0.05)	
	Media	Grupo
Licor mezcla	$1,193 \cdot 10^6$	A
<i>Ps. mendocina</i>	$4,007 \cdot 10^6$	A
<i>Ag. radiobacter</i>	$3,046 \cdot 10^6$	A
<i>Ps. alcaligenes</i>	$2,473 \cdot 10^6$	A
<i>Ps. picketii</i>	$8,301 \cdot 10^5$	A
<i>Ps. fluorescens</i>	$2,636 \cdot 10^6$	A

No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de microorganismos presentes en el agua tratada para cada uno de los ensayos realizados. En función de los datos de turbidez obtenidos cabría esperar una mayor presencia de microorganismos en el agua tratada para los ensayos de *Ag. radiobacter*, sin embargo sus valores fueron semejantes al resto de inoculaciones. Es esperable en este caso la presencia de restos de biopelícula con la presencia de microorganismos muertos o elementos de ésta (proteínas, EPS,...) que incrementan la turbidez.

Como era de esperar, no se apreciaron Indicados res de contaminación fecal en el agua tratada mediante el sistema inoculado con las nuevas bacterias, fenómeno sólo posible para el empleo de licor mezcla.

V.5.3.- Conclusiones previas

A la vista de los resultados obtenidos podemos confirmar la idoneidad de la inoculación selectiva frente a la aplicación de licor mezcla, sin embargo el tipo de microorganismo empleado para la fase inicial de formación de biopelícula influirá sobre factores como el rendimiento del proceso, en el cual la capacidad para formar biopelículas estables es determinante más que la actividad desnitrificante potencial del relleno inoculado.

Debemos igualmente considerar que el microorganismo inoculante también afectará a la presencia en el agua tratada de mayor o menor concentración de nitrito o en la mayor o menor turbidez del agua, lo cual obligará en mayor o menor medida al tratamiento posterior del efluente obtenido.

V.6.- 4ª FASE DE LA INVESTIGACIÓN A ESCALA DE LABORATORIO

Autores como Sich y Van Rijn (1997) confirmaron la idoneidad de biopelículas mixtas para la eliminación de nitrato mediante desnitrificación. En sus estudios apreciaron la presencia de bacterias tipo *Pseudomonas* implicadas en la eliminación de nitrógeno y otras tipo *Zooglea* implicadas en la formación de la biopelícula, coexistiendo ambos grupos bacterianos en el medio. Con esta idea se pretendía en esta 4ª fase utilizar mezclas de microorganismos que por un lado fuesen desnitrificantes y por otro incrementaran la estabilidad de la biopelícula. Igualmente, se trataba de buscar la combinación adecuada para reducir la posible presencia de nitrito en el medio así como la turbidez del agua tratada.

En esta fase de la investigación se mantuvieron las condiciones de trabajo anteriores en cuanto a medio de cultivo empleado para crecimiento de los microorganismos, carga hidráulica de $2 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$, eliminación del oxígeno disuelto presente en el agua a tratar y adición de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ hasta obtener una concentración constante en el agua a tratar de 0,6 mg/l de fósforo.

Para conseguir la biopelícula mixta en primer lugar se puso en crecimiento durante 48 horas en agitador orbital cada uno de los inoculantes por separado en 1 litro de medio de cultivo. Finalizado el período de crecimiento, se mezclaron en un único bote de 2 litros para ponerlo en recirculación durante 1 día logrando así la formación de la biopelícula. El crecimiento del cultivo por separado fue debido a la posible influencia de cada una de las cepas sobre la otra. Un microorganismo puede consumir mayor cantidad de fuente de carbono que el otro limitando así su crecimiento (Martienssen and Schöps, 1999) o bien puede producir sustancias inhibitoras del crecimiento bacteriano que afectaría a la otra cepa.

V.6.1.- Variables y parámetros de la 4ª fase de la investigación de choque.

La única VARIABLE que se consideró en esta fase fue:

- **Empleo de diferentes mezclas de los inoculantes empleados en la fase anterior para formación de la biopelícula.** El empleo de estas mezclas para estudiar el proceso de inoculación selectiva estuvo motivado para buscar mejoras en la formación de la biopelícula y por lo tanto en el rendimiento y estabilidad del sistema, así como en la calidad del agua tratada. Con esta idea se seleccionaron en total 5 mezclas para comparar el funcionamiento de la inoculación selectiva con cultivo puro con la mezcla de cepas . Estas mezclas fueron:
 - a) *Pseudomonas fluorescens* + *Pseudomonas mendocina*.
 - b) *Agrobacterium radiobacter* + *Pseudomonas fluorescens*.
 - c) *Pseudomonas mendocina* + *Agrobacterium radiobacter* + *Pseudomonas fluorescens*.
 - d) *Pseudomonas mendocina* + *Agrobacterium radiobacter*.
 - e) *Agrobacterium radiobacter* + *Pseudomonas pickettii*.

Los PARÁMETROS que se controlaron en el proceso, tanto sobre el relleno como sobre el agua, fueron los mismos que los indicados en el apartado V.4.1 para la fase anterior de la investigación de choque y con la misma frecuencia de muestreos.

Los resultados obtenidos se compararon con los ya mostrados anteriormente para cada uno de los inoculantes por separado. Se pretende así observar la posible mejora para cada una de las mezclas realizadas con respecto a las cepas por separado.

V.6.2.- Resultados previos de la 4ª fase

V.6.2.1.- Resultados de la mezcla *Ps. mendocina* y *Ps. fluorescens*.

a) Sobre las muestras de relleno

Comparando los valores medios obtenidos en el **recuento de microorganismos** tras 1 día en recirculación y tras 7 días en funcionamiento si se inocula la planta con la mezcla de las cepas *Ps. mendocina* y *Ps. fluorescens* o con cada una de las cepas de forma aislada, se obtuvieron los siguientes resultados:

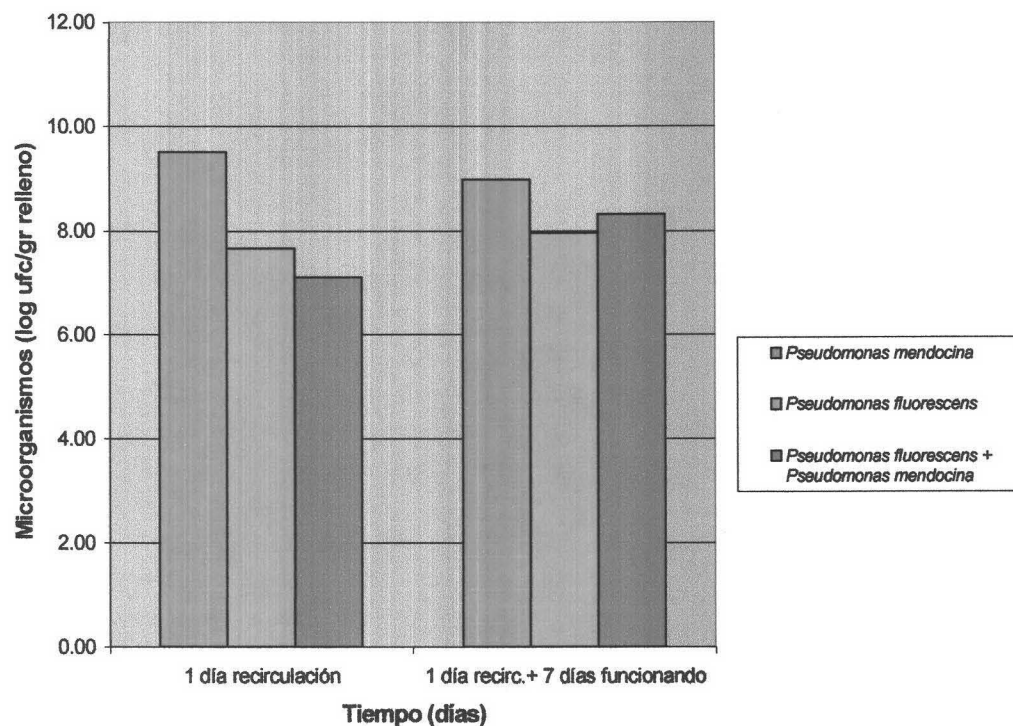


Fig.V.59. Recuentos microorganismos en el relleno para *Ps. mendocina*, *Ps. fluorescens* y la mezcla de ambas.

Tabla V.30.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el relleno tras la recirculación para los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Inoculante	2	$1,33 \cdot 10^{19}$	$6,66 \cdot 10^{18}$	9743,29	0,0000
Total (corregido)	5	$1,33 \cdot 10^{19}$			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ps. mendocina</i>	$3,19 \cdot 10^9$	A
<i>Ps. fluorescens</i>	$4,58 \cdot 10^7$	B
Mezcla	$1,27 \cdot 10^7$	B

El recuento de microorganismos en el relleno tras la recirculación presentó diferencias estadísticamente significativas entre *Ps. mendocina* y *Ps. fluorescens*, siendo el comportamiento de la mezcla muy semejante a *Ps. fluorescens*.

Tabla V.31.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el relleno tras el funcionamiento para los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Inoculante	2	$8,98 \cdot 10^{17}$	$4,49 \cdot 10^{17}$	2,51	0,2290
Total (corregido)	5	$1,43 \cdot 10^{18}$			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ps. mendocina</i>	$9,62 \cdot 10^8$	A
<i>Ps. fluorescens</i>	$8,92 \cdot 10^7$	A
Mezcla	$2,06 \cdot 10^8$	A

El recuento de microorganismos en el relleno tras el funcionamiento no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los inoculantes. Hay que considerar que a diferencia de lo sucedido con *Ps. mendocina* la mezcla mostró un incremento en la densidad bacteriana, siendo ésta incluso superior a la de *Ps. fluorescens*.

Comparando los valores medios obtenidos de la **actividad desnitrificante** tras 1 día en recirculación y tras 7 días en funcionamiento si se inocula la planta con la mezcla de las cepas *Ps. medocina* y *Ps. fluorescens* o con cada una de las cepas de forma aislada, se obtuvieron los siguientes resultados:

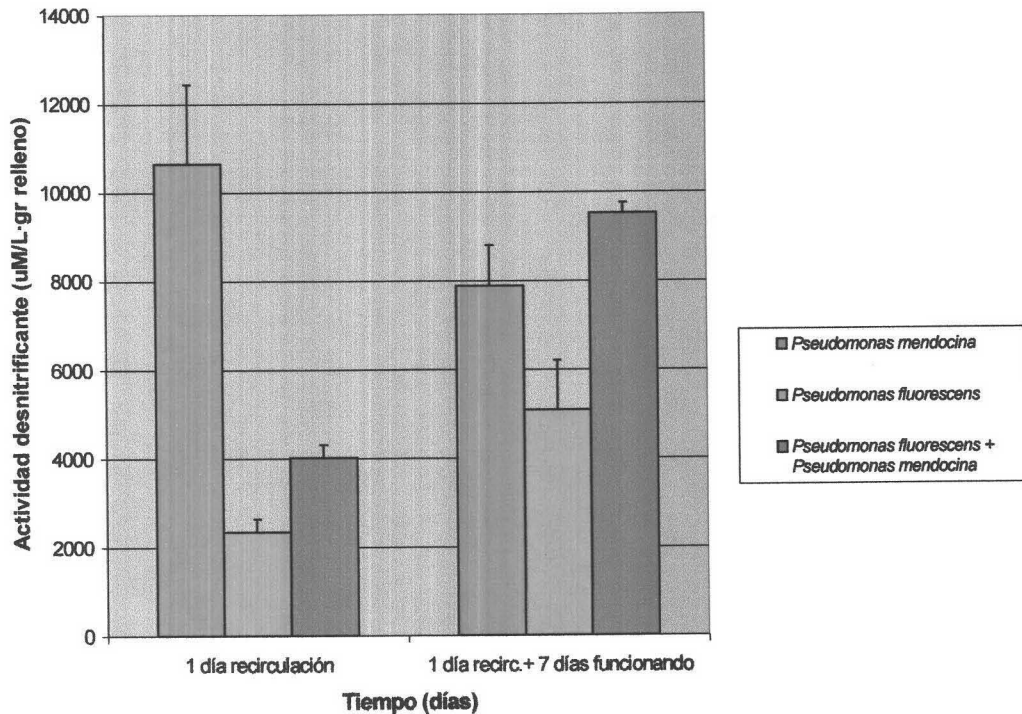


Fig.V.60. Actividad desnitrificante para *Ps. mendocina*, *Ps. fluorescens* y la mezcla de ambas.

(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Tabla V.32.- Análisis estadístico realizado para la actividad desnitrificante en el relleno tras la recirculación para los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Inoculante	2	7,68*10 ⁷	3,84*10 ⁷	34,39	0,0085
Total (corregido)	5	8,02*10 ⁷			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ps. mendocina</i>	10645	A
<i>Ps. fluorescens</i>	2359	B
Mezcla	4021	B

La actividad desnitrificante tras la recirculación presentó diferencias estadísticamente significativas entre *Ps. mendocina* y *Ps. fluorescens* y la mezcla de ambas, siendo *Ps. mendocina* la que presentó mayor actividad.

Tabla V.33.- Análisis estadístico realizado para la actividad desnitrificante en el relleno tras el funcionamiento para los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Inoculante	2	2,01*10 ⁷	1,01*10 ⁷	14,06	0,0299
Total (corregido)	5	2,22*10 ⁷			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ps. mendocina</i>	7875	A
<i>Ps. fluorescens</i>	5083	B
Mezcla	9517	A

La actividad desnitrificante tras el funcionamiento presentó diferencias estadísticamente significativas entre *Ps. fluorescens* y *Ps. mendocina* y la mezcla de ambas, siendo *Ps. fluorescens* la que presentó menor actividad. Hay que destacar que al contrario de lo sucedido con *Ps. mendocina* que descendía su actividad desnitrificante tras la puesta en marcha del sistema, la mezcla incrementó esta actividad al igual que sucediera para el recuento de microorganismos.

En vista de los resultados obtenidos podemos pensar que la biopelícula es inicialmente colonizada por *Ps. fluorescens* en mayor cuantía que por *Ps. mendocina*, tal como muestra la similitud entre los datos de *Ps. fluorescens* y la mezcla tanto en actividad desnitrificante como en densidad bacteriana. Si se aprecia la biopelícula tras la puesta en marcha, ésta experimenta un incremento para la mezcla tanto en la actividad como en la densidad bacteriana alcanzando valores superiores a los dos inoculantes por separado. Se consigue de este modo una biopelícula estable en 24 horas, carácter dado por la presencia de *Ps. fluorescens* el cual permite mayor adherencia de *Ps. mendocina* (cepa con mayor actividad desnitrificante) y por lo tanto un mayor desarrollo de actividad desnitrificante.

b) Resultados sobre las muestras de agua

Como podemos apreciar en los resultados obtenidos (Fig. V.61.) y en los análisis estadísticos realizados (Tabla V.34.) no se apreció una mejora sustancial en la capacidad de eliminar nitrógeno al emplear la mezcla de inoculantes, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de la mezcla y los inoculantes separados.

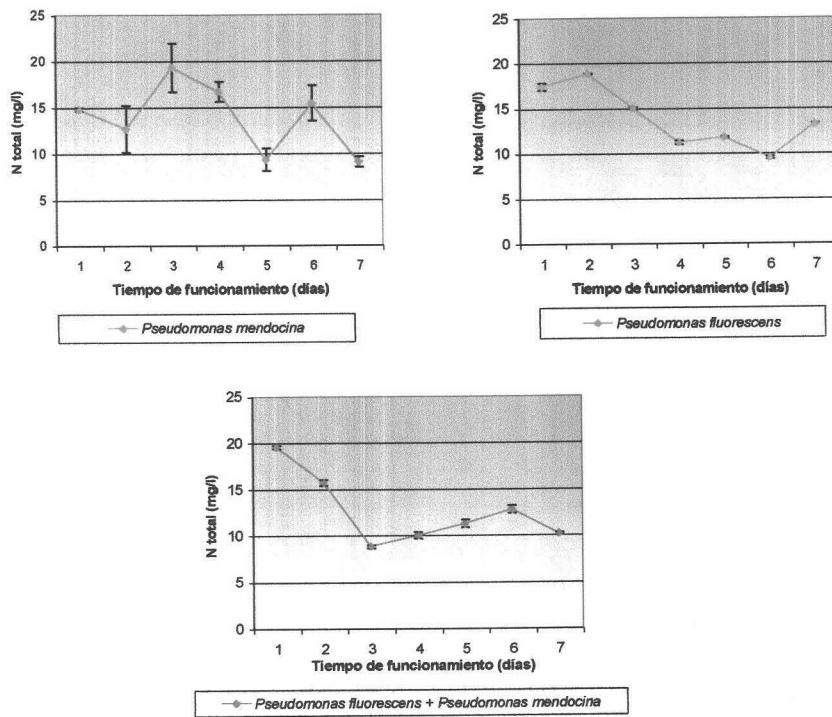


Fig.V.61. Nitrógeno total en el agua de salida para *Ps. mendocina*, *Ps. fluorescens* y la mezcla de ambas.
(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

La mejora conseguida en la estabilidad de la biopelícula al emplear la mezcla se vio reflejada en el mejor rendimiento del sistema aunque éste no fue significativo, no logrando valores en el agua tratada acordes con las exigencias legislativas.

Tabla V.34.- Análisis estadístico realizado para la concentración de nitrógeno total en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 días.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	274,806	274,806	32,81	0,0000
Inoculantes	2	21,786	10,893	1,30	0,2801
Total (corregido)	62	790,739			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ps. mendocina</i>	13,89	A
<i>Ps. fluorescens</i>	13,86	A
Mezcla	12,63	A

En el análisis realizado de la concentración diaria de nitrito en el agua de salida una vez puesto en funcionamiento el sistema tras la inoculación de la planta con la mezcla de las cepas *Ps. mendocina* y *Ps. fluorescens* o con cada una de las cepas de forma aislada, se obtuvieron los siguientes resultados:

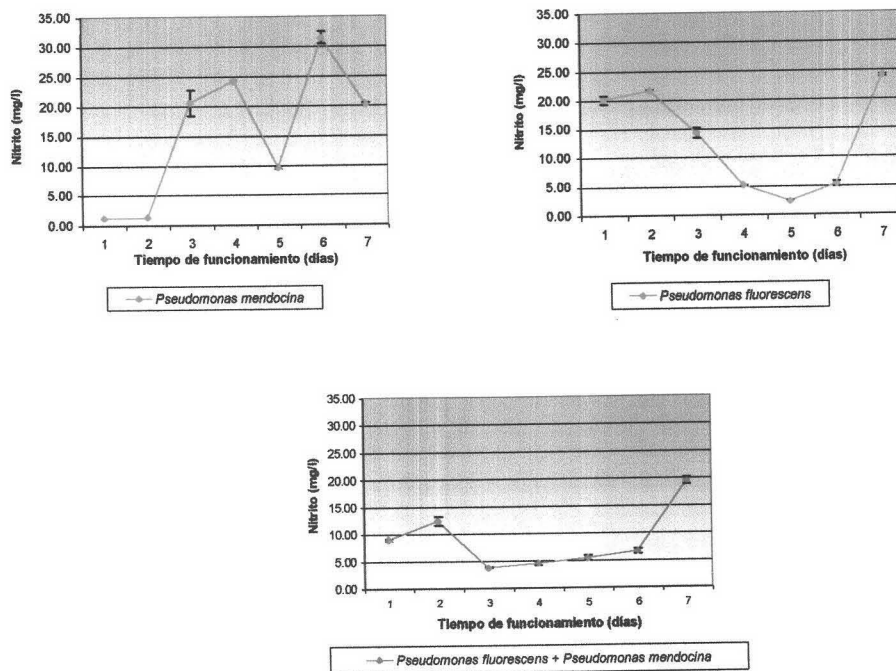


Fig.V.62. Concentración de nitrito en el agua de salida para *Ps. mendocina*, *Ps. fluorescens* y la mezcla de ambas. (Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Tabla V.35.- Análisis estadístico realizado para la concentración de nitrito en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 días.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	328,686	328,686	4,67	0,0348
Inoculantes	2	503,369	251,685	3,57	0,0343
Total (corregido)	62	4987,5			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ps. mendocina</i>	15,53	A
<i>Ps. fluorescens</i>	13,25	A
Mezcla	8,73	B

Como puede comprobarse del análisis estadístico realizado, el nitrito en el agua de salida presentó diferencias estadísticamente significativas entre los días de funcionamiento y entre los inoculantes empleados, dándose los menores valores si se realiza la inoculación con la mezcla de las cepas *Ps. mendocina* y *Ps. fluorescens*.

La mayor estabilidad de la biopelícula permitió una menor acumulación de nitrito en el agua tratada siendo esto una ventaja frente a la inoculación con una única bacteria, al reducir la contundencia de los tratamientos posteriores a realizar.

En el análisis realizado de la **turbidez en el agua de salida** una vez puesto en funcionamiento el sistema tras la inoculación de la planta con la mezcla de las cepas *Ps. medocina* y *Ps. fluorescens* o con cada una de las cepas de forma aislada, se obtuvieron los siguientes resultados:

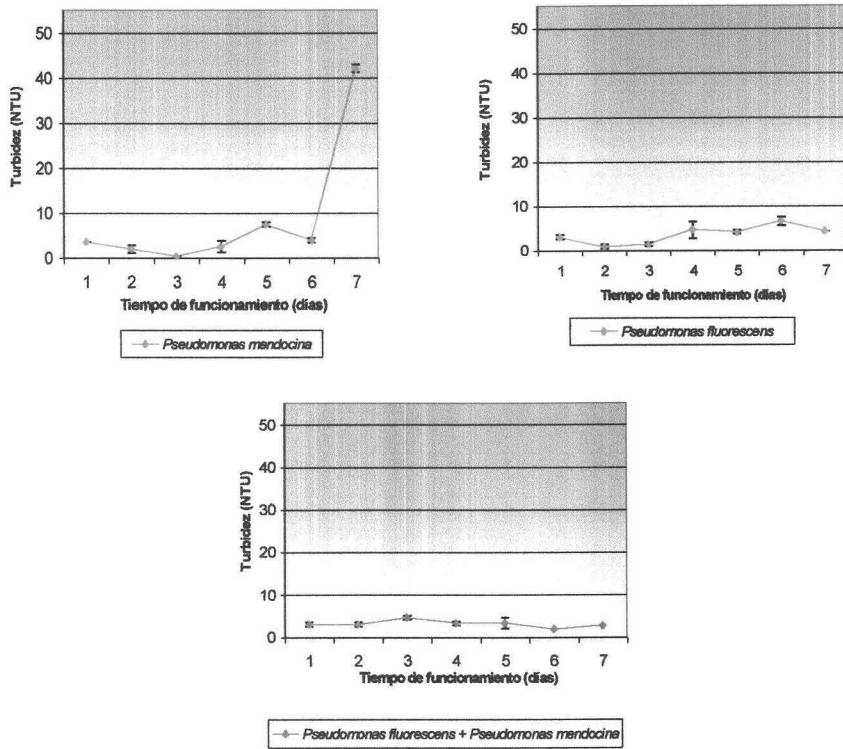


Fig. V.63. Turbidez en el agua de salida para *Ps. mendocina*, *Ps. fluorescens* y la mezcla de ambas.

(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Tabla V.36.- Análisis estadístico realizado para la turbidez en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 días.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	704,44	704,44	12,34	0,0009
Inoculantes	2	416,973	208,487	3,65	0,0319
Total (corregido)	62	4488,53			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ps. mendocina</i>	8,86	A
<i>Ps. fluorescens</i>	3,63	B
Mezcla	3,20	B

En el análisis realizado del **recuento de microorganismos totales en el agua de salida** una vez puesto en funcionamiento el sistema tras la inoculación de la planta con la mezcla de las cepas *Ps. medocina* y *Ps. fluorescens* o con cada una de las cepas de forma aislada, se obtuvieron los siguientes resultados:

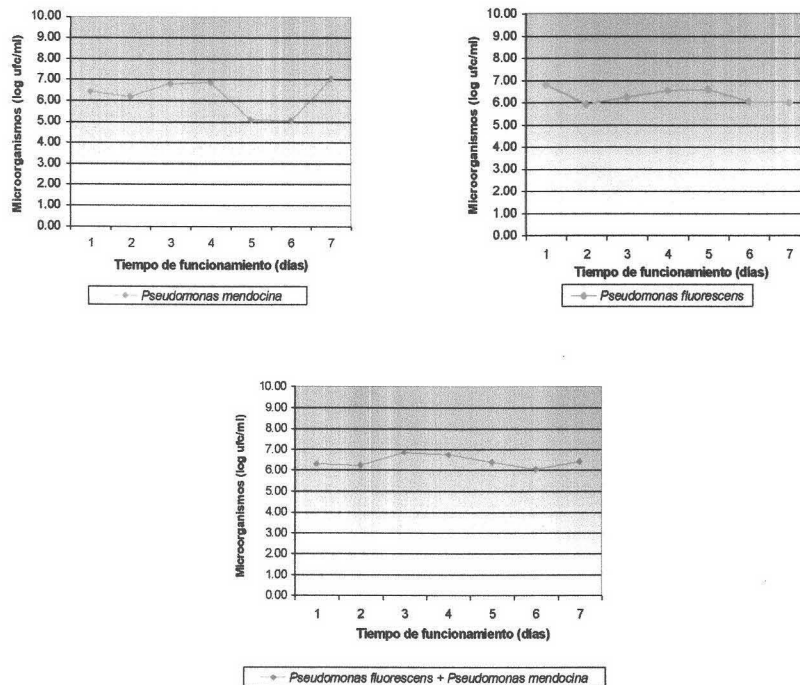


Fig. V.64. Microorganismos en el agua de salida para *Ps. mendocina*, *Ps. fluorescens* y la mezcla de ambas.

Tabla V.37.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	$7,47 \cdot 10^9$	$7,47 \cdot 10^9$	0,00	0,9766
Inoculantes	2	$1,56 \cdot 10^{13}$	$7,79 \cdot 10^{12}$	0,91	0,4120
Total (corregido)	41	$3,42 \cdot 10^{14}$			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ps. mendocina</i>	$4,11 \cdot 10^6$	A
<i>Ps. fluorescens</i>	$2,63 \cdot 10^6$	A
Mezcla	$3,24 \cdot 10^6$	A

La presencia de microorganismos en el agua tratada fue semejante tanto en la mezcla como para las inoculaciones individuales, no detectándose diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Sin embargo en los valores de turbidez sí se aprecian mejoras frente a los valores obtenidos para *Ps. mendocina*.

Con la mezcla de una cepas con gran producción de EPS se logra incrementar la adherencia de otra con menor producción de polisacárido capsular y a su vez se mejora la actividad desnitrificante de la cepa más adherente al usar un segundo inoculante con gran capacidad de eliminación de nitrógeno. Estas mejoras en la biopelícula se apreciaron en el agua tratada, siendo especialmente significativas en la reducción de nitrito y turbidez del agua más que para la eliminación total de nitrógeno.

V.6.2.2.- Resultados de la mezcla *Agrobacterium radiobacter* y *Pseudomonas fluorescens*

a) Sobre las muestras de relleno

Al igual que sucedió al mezclar *Ps. fluorescens* con *Ps. mendocina*, se obtuvo una biopelícula estable al mezclar esta primera cepa, destacada por su producción de EPS, con *Ag. radiobacter*, cepa que por sí sola era capaz de formar biopelículas estables y activas. Tras la inoculación inicial, el contenido de microorganismos con la mezcla fue semejante al de *Ps. fluorescens* (Tabla V.38.), sin embargo tras el funcionamiento esta bioepícula incrementó su densidad bacteriana en algo más de 2 logaritmos (Figura V.65.), comportamiento más acorde con el de *Ag. radiobacter* a pesar de apreciarse igualmente semejanzas con *Ps. fluorescens* (Tabla V.39.).

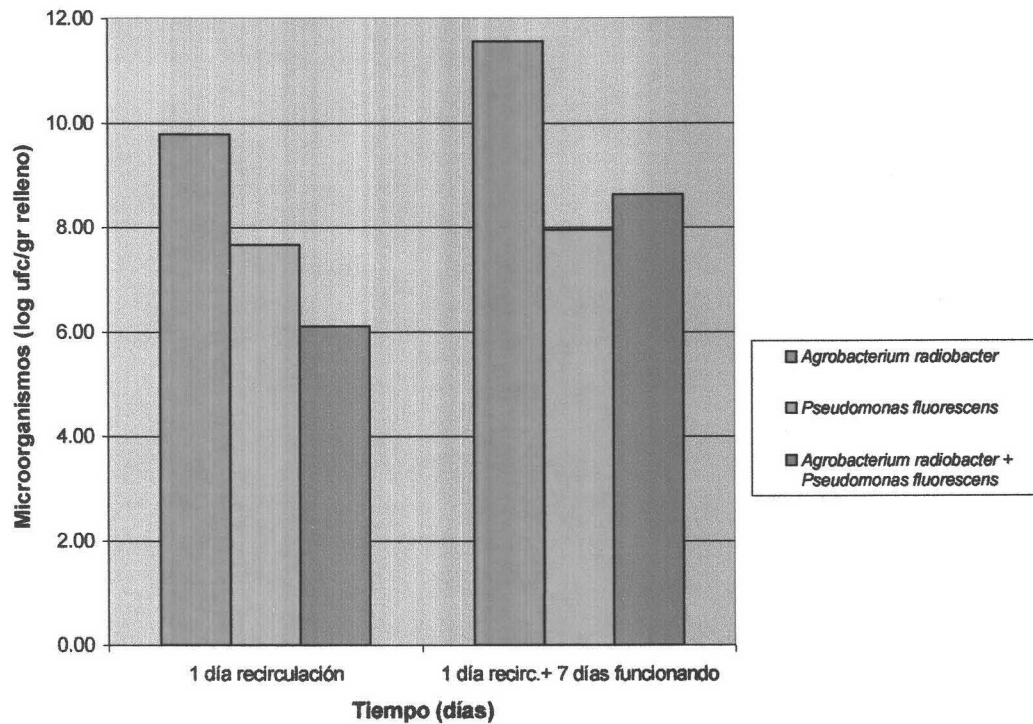


Fig.V.65. Microorganismos en el relleno para *Agrobacterium radiobacter*, *Ps. fluorescens* y la mezcla de ambas.

Tabla V.38.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el relleno tras la recirculación para los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Inoculante	2	4,96*10 ¹⁹	2,48*10 ¹⁹	21541,35	0,0000
Total (corregido)	5	4,96*10 ¹⁹			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ag. radiobacter</i>	6,12*10 ⁹	A
<i>Ps. fluorescens</i>	4,58*10 ⁷	B
Mezcla	1,28*10 ⁶	B

Tabla V.39.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el relleno tras el funcionamiento para los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Inoculante	2	$1,68 \cdot 10^{23}$	$8,39 \cdot 10^{22}$	10,59	0,0437
Total (corregido)	5	$1,91 \cdot 10^{23}$			

Test t de Student ($P < 0.05$)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ag. radiobacter</i>	$3,55 \cdot 10^{11}$	A
<i>Ps. fluorescens</i>	$8,93 \cdot 10^7$	B
Mezcla	$4,2 \cdot 10^8$	B

Donde sí se apreció una considerable ventaja fue en el desarrollo de la actividad desnitrificante (Fig. V.66.) que se comportó para la mezcla inicialmente de forma semejante a *Ag. radiobacter* (Tabla V.40).

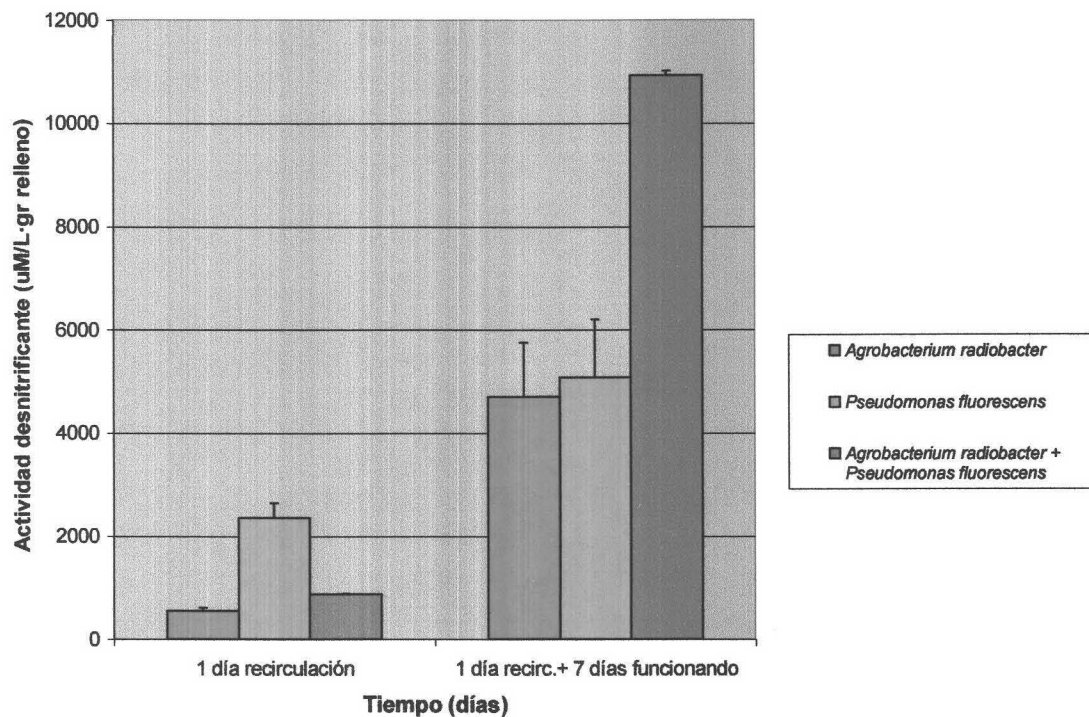


Fig.V.66. Actividad desnitrificante para *Agrobacterium radiobacter*, *Ps. fluorescens* y la mezcla de ambas.
(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Tabla V.40.- Análisis estadístico realizado para la actividad desnitrificante en el relleno tras la recirculación para los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Inoculante	2	3,71*10 ⁶	1,86*10 ⁶	68,54	0,0031
Total (corregido)	5	3,79*10 ⁶			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ag. radiobacter</i>	552	A
<i>Ps. fluorescens</i>	2359	B
Mezcla	877	A

Tras una semana en funcionamiento se apreció un incremento considerable de la actividad desnitrificante en la mezcla resultando sobre los dos inoculantes cuando se aplicaban de forma individual (Tabla V.41.).

Tabla V.41.- Análisis estadístico realizado para la actividad desnitrificante en el relleno tras el funcionamiento para los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Inoculante	2	4,88*10 ⁷	2,44*10 ⁷	30,73	0,0100
Total (corregido)	5	5,12*10 ⁷			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ag. radiobacter</i>	4705	A
<i>Ps. fluorescens</i>	5083	A
Mezcla	10937	B

Se logra nuevamente con la inoculación mixta una mejora en la estabilidad de la biopelícula que si bien en este caso no alcanza la densidad bacteriana lograda con *Ag. radiobacter*, la actividad desnitrificante es muy superior. Igual que se indicó anteriormente, la inoculación con *Ps. fluorescens* y otro microorganismo mejora la biopelícula obtenida.

b) Resultados sobre las muestras de agua

Con el análisis realizado de la concentración de nitrato y nitrito en el agua de salida se obtiene el valor de **nitrógeno total diario** una vez puesto en funcionamiento el sistema si se inocula la planta con la mezcla de las cepas *Ag. radiobacter* y *Ps. fluorescens* o con cada una de las cepas de forma aislada, obteniéndose los siguientes resultados:

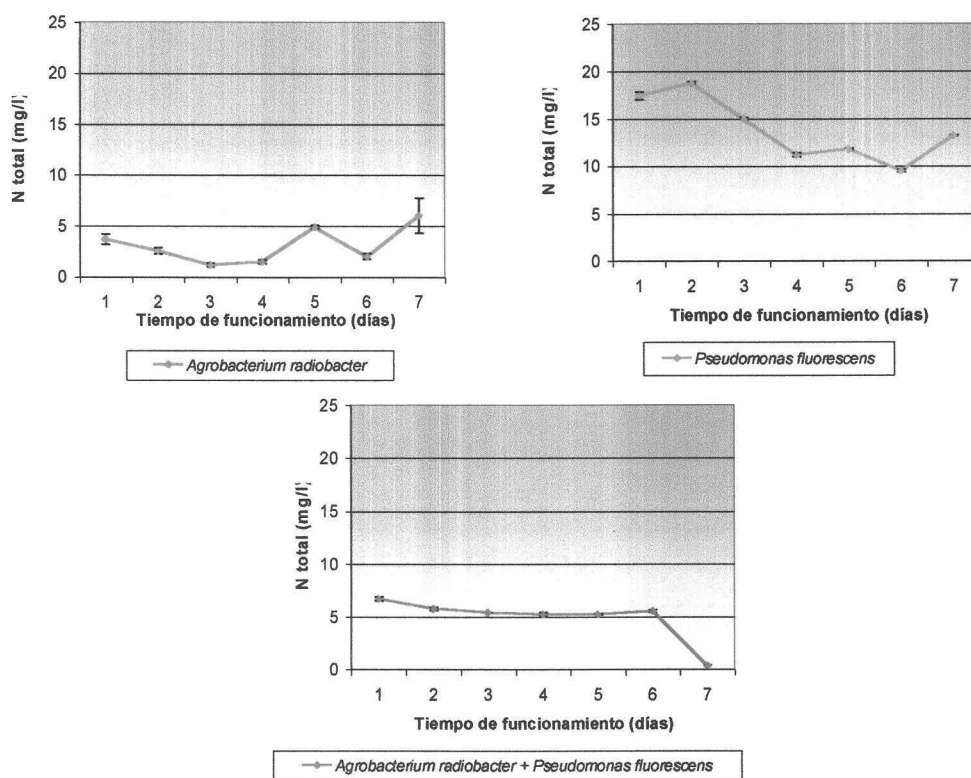


Fig. V.67. Nitrógeno total diario en el agua de salida para *Agrobacterium radiobacter*, *Pseudomonas fluorescens* y la mezcla de ambas
(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Tanto para el caso de emplear *Agrobacterium radiobacter* en el proceso de formación de la biopelícula como para la mezcla se obtuvieron valores de nitrógeno total en el agua tratada inferiores al máximo permitido por la legislación (11 mg/l) desde el primer día de la puesta en funcionamiento del sistema.

Tabla V.42.- Análisis estadístico realizado para la concentración de nitrógeno total en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 días.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	69,809	69,809	14,64	0,0003
Inoculantes	2	1391,72	695,86	145,89	0,0000
Total (corregido)	62	1742,94			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ag. radiobacter</i>	3,13	A
<i>Ps. fluorescens</i>	13,86	B
Mezcla	4,90	A

Como puede comprobarse del análisis estadístico realizado, el nitrógeno total en el agua de salida presentó diferencias estadísticamente significativas entre los días de funcionamiento y entre los inoculantes empleados, presentando la mezcla mejores resultados que si la inoculación se realizaba solamente con *Ps. fluorescens*.

Se logró de este modo mejorar los resultados obtenidos con biopelículas formadas con *Ps. fluorescens*, pero no se apreciaron mejoras con respecto a la aplicación de *Ag. radiobacter*.

En el análisis realizado de la **concentración diaria de nitrito en el agua de salida** una vez puesto en funcionamiento el sistema si se inocula la planta con la mezcla de las cepas *Ag. radiobacter* y *Ps. fluorescens* o con cada una de las cepas de forma aislada, se obtuvieron los siguientes resultados:

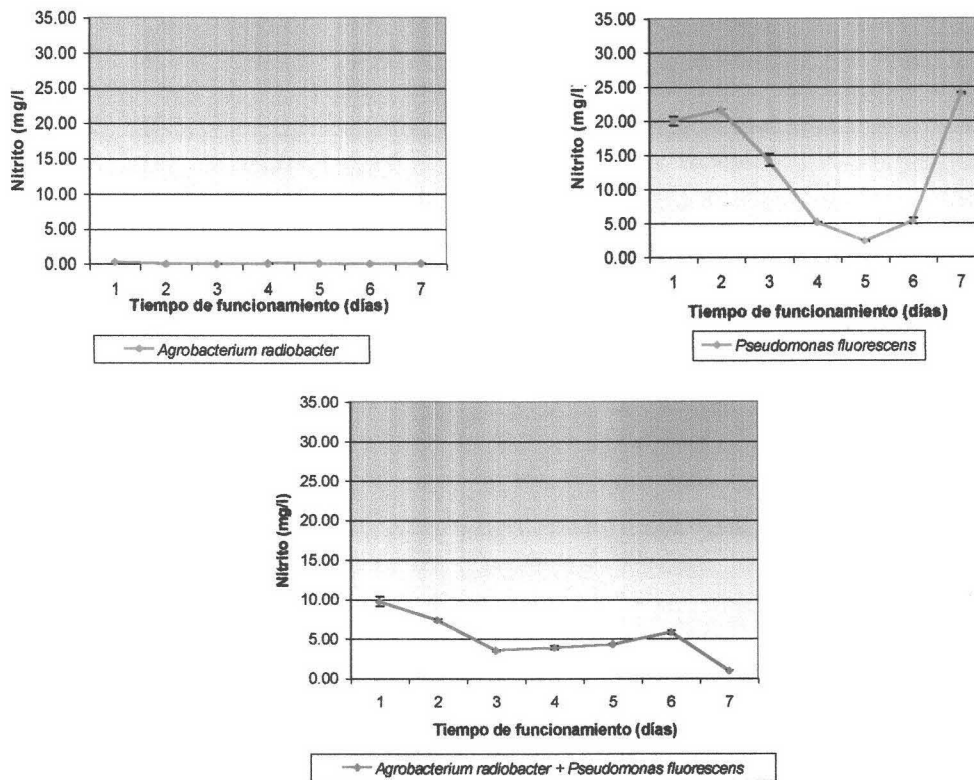


Fig. V.68. Concentración de nitrito diaria en el agua de salida para *Agrobacterium radiobacter*, *Pseudomonas fluorescens* y la mezcla de ambas.
(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Tabla V.43.- Análisis estadístico realizado para la concentración de nitrito en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 días.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	135,902	135,902	5,50	0,0224
Inoculantes	2	1856,05	928,027	37,54	0,0000
Total (corregido)	62	3450,58			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ag. radiobacter</i>	0,08	A
<i>Ps. fluorescens</i>	13,25	B
Mezcla	5,07	C

Como puede comprobarse del análisis estadístico realizado, el nitrato en el agua de salida presentó diferencias estadísticamente significativas entre los días de funcionamiento y entre los inoculantes empleados. Los menores valores de concentración de nitrato se dieron en el caso de emplear la inoculación selectiva con *Agrobacterium radiobacter*, estando prácticamente siempre el valor por debajo del máximo permitido por la legislación (0,1 mg/l). En el caso de la inoculación realizada con la mezcla de las cepas, los valores mejoraron únicamente respecto al sistema inoculado con *Ps. fluorescens*.

En el análisis realizado de la turbidez en el agua de salida se obtuvieron los siguientes resultados:

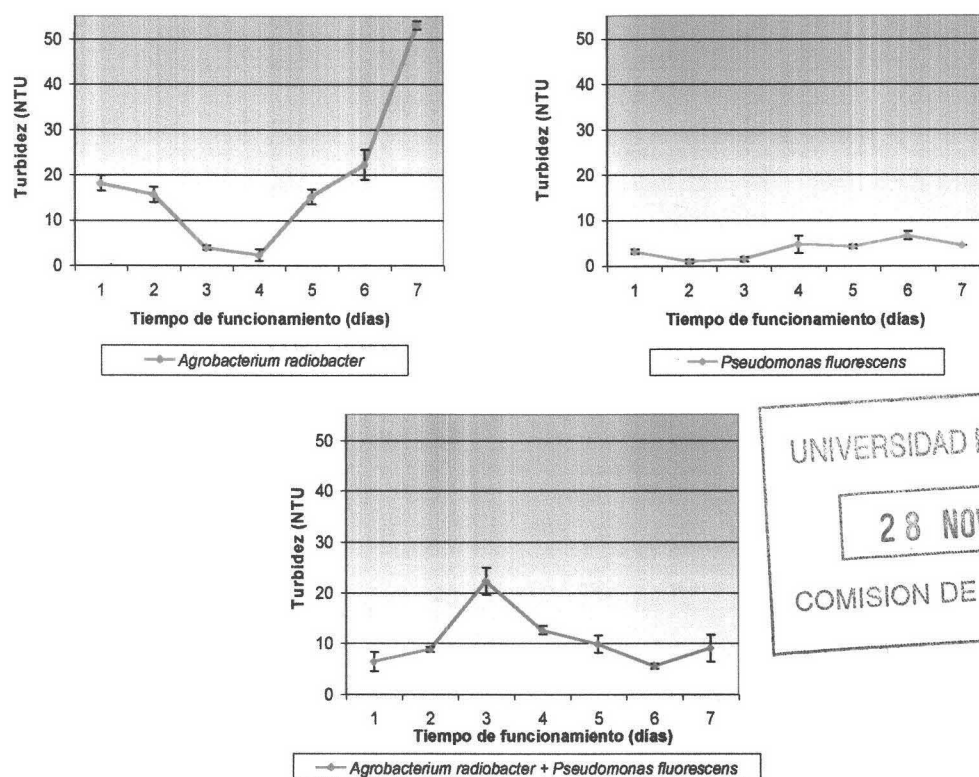


Fig. V.69. Valor diario de la turbidez en el agua de salida para *Agrobacterium radiobacter*, *Pseudomonas fluorescens* y la mezcla de ambas.
(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

UNIVERSIDAD DE GRANADA
28 NOV. 2000
COMISION DE DOCTORADO

Tabla V.44.- Análisis estadístico realizado para la turbidez en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 días.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	669,213	669,213	7,62	0,0077
Inoculantes	2	2362,42	1181,21	13,45	0,0000
Total (corregido)	62	8214,92			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ag. radiobacter</i>	18,62	A
<i>Ps. fluorescens</i>	3,63	B
Mezcla	10,66	C

Como puede comprobarse del análisis estadístico realizado, la turbidez en el agua de salida presentó diferencias estadísticamente significativas entre los días de funcionamiento y entre los inoculantes empleados. Los menores valores de la turbidez se observaron para el sistema inoculado con *Ps. fluorescens*, cepa con alta capacidad de producción de EPS y por tanto con buena adherencia al relleno, mejorando en este caso los valores obtenidos con *Ag. radiobacter* al realizar la mezcla con *Ps. fluorescens*.

Para los análisis realizados sobre el **recuento de microorganismos totales en el agua de salida** (Figura V.70.), no se apreciaron diferencias significativas entre los días de funcionamiento pero sí entre la mezcla y los inoculantes por separado (Tabla V.45.), aunque los valores obtenidos fueron semejantes para los tres.

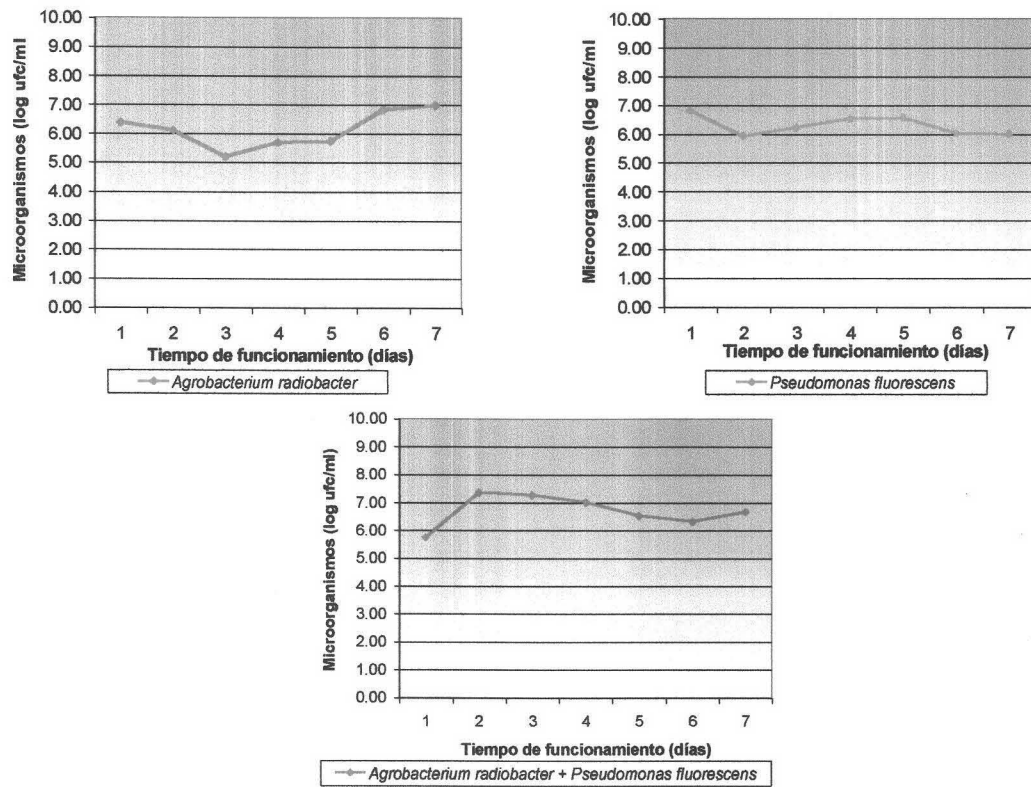


Fig. V.70. Recuento de microorganismos diario en el agua de salida para *Agrobacterium radiobacter*, *Pseudomonas fluorescens* y la mezcla de ambas.

Tabla V.45.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	$1,53 \cdot 10^{13}$	$1,53 \cdot 10^{13}$	0,53	0,4726
Inoculantes	2	$3,51 \cdot 10^{14}$	$1,75 \cdot 10^{14}$	6,01	0,0054
Total (corregido)	41	$11,47 \cdot 10^{15}$			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ag. radiobacter</i>	$3,01 \cdot 10^6$	A
<i>Ps. fluorescens</i>	$2,63 \cdot 10^6$	A
Mezcla	$8,94 \cdot 10^6$	B

A diferencia de la mezcla *Ps. mendocina* y *Ps. fluorescens*, en este caso se mejoran en algunos aspectos los resultados obtenidos para cada inoculante por separado. Así los altos valores de turbidez presentados en el sistema inoculado con *Ag. radiobacter* se mejoran al mezclar esta cepa con *Ps. fluorescens*, disminuyendo en algo más de 6 NTU la turbidez tras 1 día de recirculación y 7 de funcionamiento, regulando y estabilizando este parámetro, por lo que se consigue reducir la eliminación de sustancias al medio que incrementan este parámetro.

Para el resto de parámetros controlados tan solo se mejoran los valores alcanzados en el sistema inoculado con *Ps. fluorescens* pero en ningún caso al de *Ag. radiobacter* que sigue siendo el proceso más efectivo de todos los ensayados.

V.6.2.3.- Resultados de la mezcla *Pseudomonas mendocina*, *Agrobacterium radiobacter* y *Pseudomonas fluorescens*

a) Sobre las muestras de relleno

Al contrario de lo que cabría esperar, la mezcla de los tres microorganismos empleados en las inoculaciones mixtas anteriores, presentó biopelículas menos estables que para las uniones en grupos de dos. En este ensayo la densidad de microorganismos tras la recirculación fue superior a la de *Ps. fluorescens*, fenómeno que no sucedía en los ensayos anteriores (Tabla V.46.), sin embargo el número total de microorganismos descendía tras 7 días de puesta en marcha (Figura V. 71.) tal como ocurría con *Ps. mendocina*.

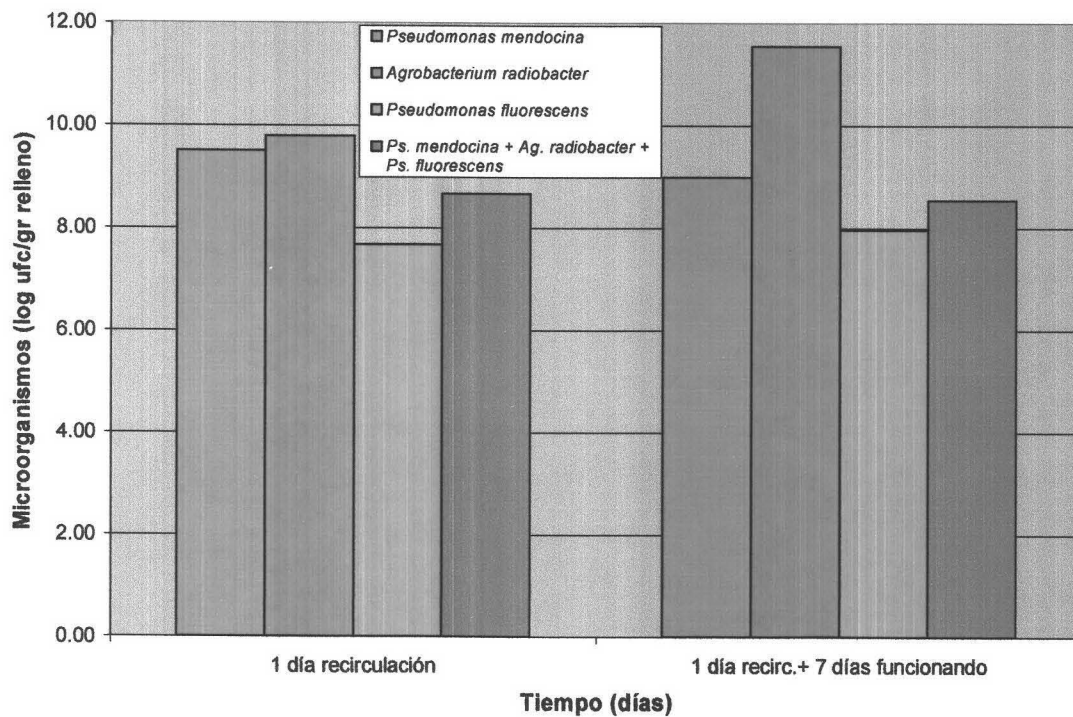


Fig.V.71. Recuentos microorganismos en el relleno para *Ps. mendocina*, *Ag. radiobacter*, *Ps. fluorescens* y la mezcla de las tres.

Tabla V.46.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el relleno tras la recirculación para los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Inoculantes	3	$4,76 \cdot 10^{19}$	$1,59 \cdot 10^{19}$	12079,08	0,0000
Total (corregido)	7	$4,76 \cdot 10^{19}$			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ps. mendocina</i>	$3,19 \cdot 10^9$	A
<i>Ag. radiobacter</i>	$6,12 \cdot 10^9$	B
<i>Ps. fluorescens</i>	$4,58 \cdot 10^7$	C
Mezcla	$4,53 \cdot 10^8$	D

Tras el funcionamiento se alcanzó una densidad bacteriana semejante a la que presentó la inoculación con *Ps. fluorescens* o *Ps. mendocina*, existiendo en todo caso diferencias estadísticamente significativas con la inoculación empleando *Ag. radiobacter* (Tabla V.47.).

Tabla V.47.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el relleno tras el funcionamiento para los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Inoculante	3	$1,88 \cdot 10^{23}$	$6,28 \cdot 10^{22}$	10,58	0,0226
Total (corregido)	7	$2,12 \cdot 10^{23}$			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ps. mendocina</i>	$9,62 \cdot 10^8$	A
<i>Ag. radiobacter</i>	$3,55 \cdot 10^{11}$	B
<i>Ps. fluorescens</i>	$8,92 \cdot 10^7$	A
Mezcla	$3,43 \cdot 10^8$	A

Hay que destacar que la actividad desnitrificante mostrada (Fig. V.72.) fue semejante tras la inoculación para *Ag. radiobacter*, *Ps. fluorescens* y la mezcla ensayada, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre estas inoculaciones y *Ps. mendocina* (Tabla V.48.).

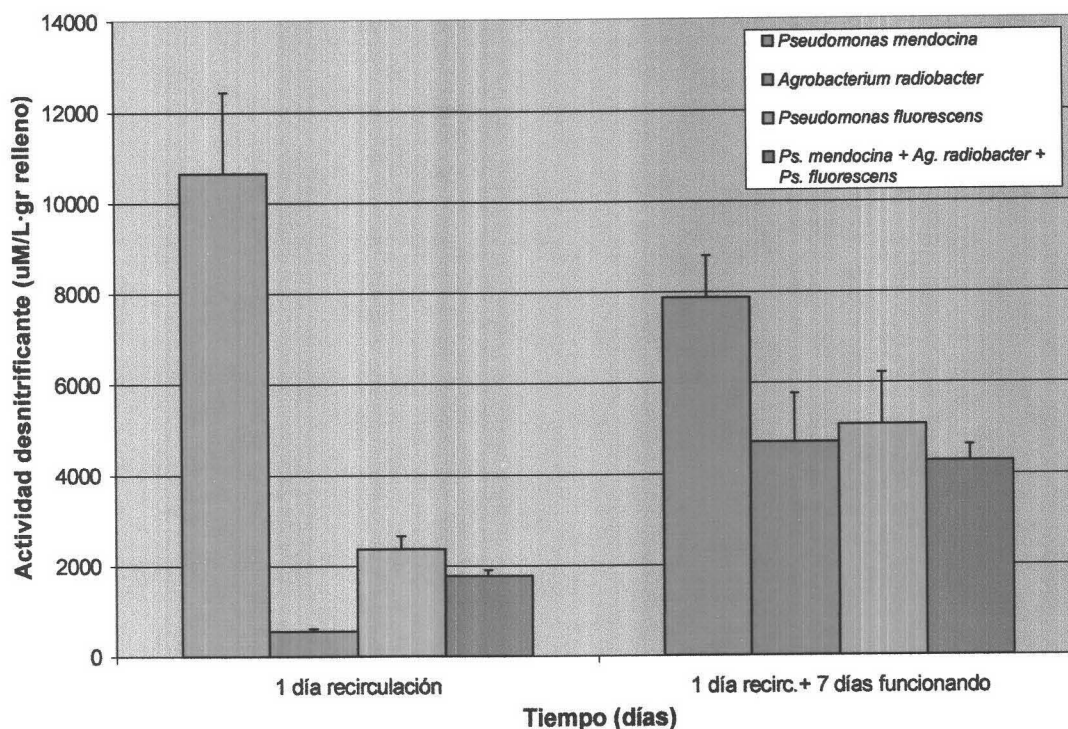


Fig.V.72. Actividad desnitrificante para *Ps. mendocina*, *Ag. radiobacter*, *Ps. fluorescens* y la mezcla de las tres.

(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Tabla V.48.- Análisis estadístico realizado para la actividad desnitrificante en el relleno tras la recirculación para los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza						
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia	
Inoculantes	3	$1,27 \cdot 10^8$	$4,24 \cdot 10^7$	51,60	0,0012	
Total (corregido)	7	$1,31 \cdot 10^8$				

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ps. mendocina</i>	10645	A
<i>Ag. radiobacter</i>	552	B
<i>Ps. fluorescens</i>	2359	B
Mezcla	1766	B

Tras los siete días en funcionamiento encontramos un comportamiento diferente para esta mezcla, ya que la actividad desnitrificante presentada fue análoga a la mostrada para las inoculaciones individuales, no apreciándose diferencias estadísticamente significativas entre cada ensayo (Tabla V.49.).

Tabla V.49.- Análisis estadístico realizado para la actividad desnitrificante en el relleno tras el funcionamiento para los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Inoculante	3	$1,59 \cdot 10^7$	$5,29 \cdot 10^6$	6,36	0,0529
Total (corregido)	7	$3,32 \cdot 10^6$			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ps. mendocina</i>	7875	A
<i>Ag. radiobacter</i>	4705	A
<i>Ps. fluorescens</i>	5083	A
Mezcla	4279	A

Podemos afirmar ante estos resultados que esta mezcla dio lugar a una biopelícula menos activa y menos estable, la cual perdía densidad con el funcionamiento. No se logró pues mejorar las características de la biopelícula debido probablemente a antagonismos entre la unión de estas tres cepas.

b) Resultados sobre las muestras de agua

Como era de esperar, la mezcla no mejoró en rendimiento de eliminación de nitrógeno a ninguna de las inoculaciones individuales (Figura V.73.) siendo semejante al rendimiento logrado con *Ps. mendocina* y *Ps. fluorescens*. El rendimiento alcanzado con *Ag. radiobacter* fue considerablemente mejor que el de la mezcla, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Tabla V.50.)

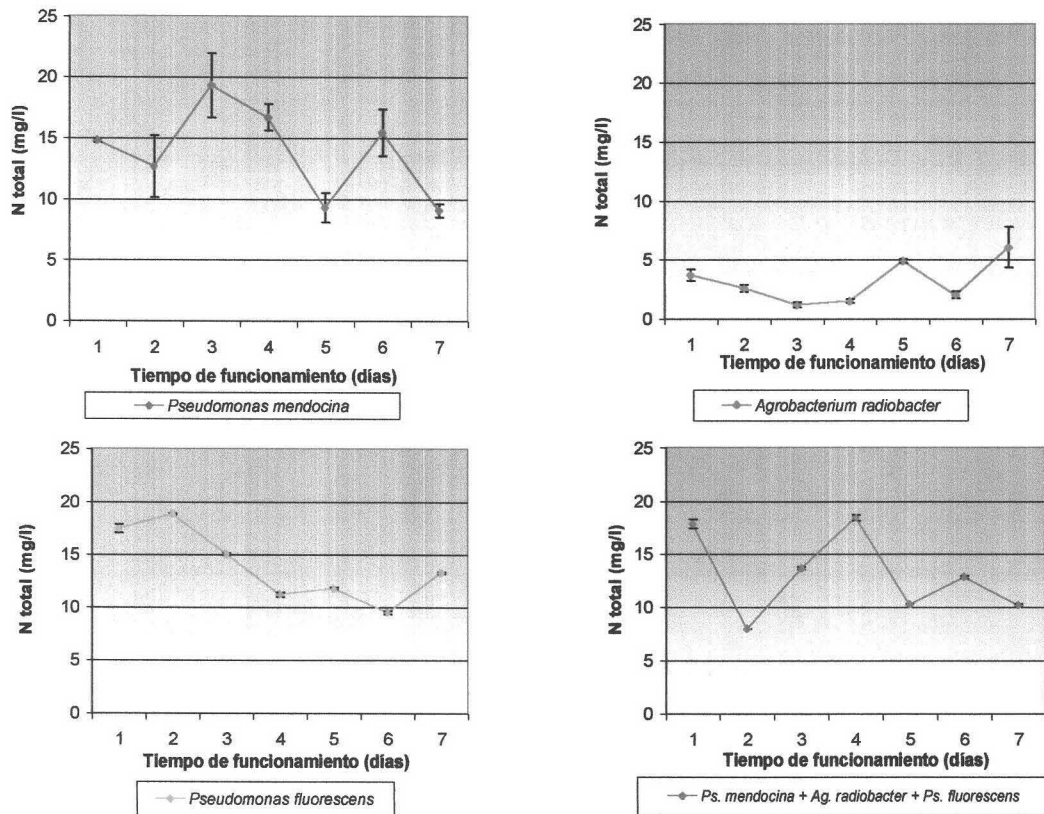


Fig. V.73. Nitrógeno total diario en el agua de salida para *Ps. mendocina*, *Ag. radiobacter*, *Ps. fluorescens* y la mezcla de las tres.
(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Tabla V.50.- Análisis estadístico realizado para la concentración de nitrógeno total en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 días.

Análisis de varianza						
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia	
Días de funcionamiento	1	106,218	106,218	11,17	0,0013	
Inoculantes	3	1735,99	578,662	60,85	0,0000	
Total (corregido)	83	2593,41				

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ps. mendocina</i>	13,90	A
<i>Ag. radiobacter</i>	3,13	B
<i>Ps. fluorescens</i>	13,86	A
Mezcla	13,03	A

Para la presencia de nitrito en el agua tratada si se encontró un comportamiento semejante con el de las mezclas realizadas anteriormente, lográndose concentraciones intermedias entre las más altas presentadas por *Ps. fluorescens* y *Ps. mendocina* y las más bajas dadas por *Ag. radiobacter* (Fig. V.73.).

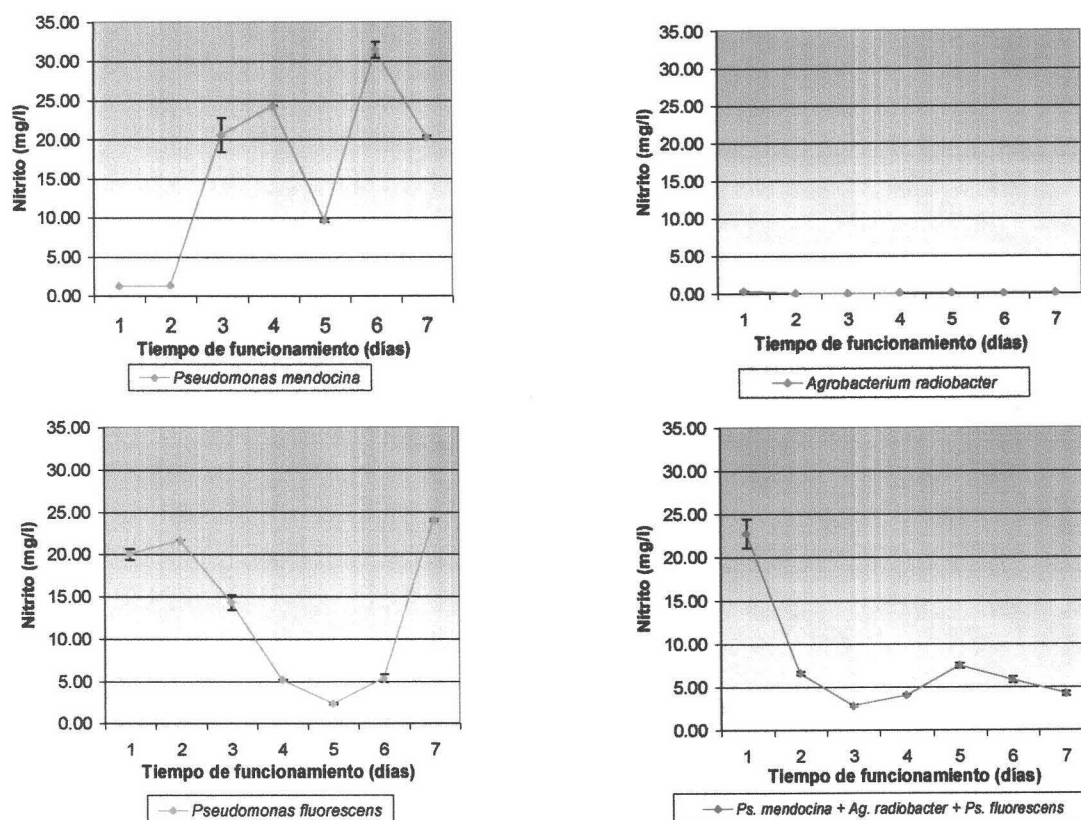


Fig. V.74.- Concentración de nitrito diaria en el agua de salida para *Ps. mendocina*, *Ag. radiobacter*, *Ps. fluorescens* y la mezcla de las tres
(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Tal como sucedió para las mezclas anteriores existían diferencias estadísticamente significativas entre la mezcla y las inoculaciones individuales (Tabla V.51.). La presencia en la misma biopelícula de cepas que acumulan nitrito y otras que no lo acumulan puede llegar a un equilibrio en el sistema que reduzca la acumulación, tal y como describió Martienssen y Schöps (1999) para comunidades bacterianas formadas por tres especies diferentes.

Tabla V.51.- Análisis estadístico realizado para la concentración de nitrito en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	11,952	11,952	0,20	0,6572
Inoculantes	3	2981,79	993,93	16,51	0,0000
Total (corregido)	83	7750,3			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ps. mendocina</i>	15,53	A
<i>Ag. Radiobacter</i>	0,08	B
<i>Ps. fluorescens</i>	13,25	A
Mezcla	7,66	C

Igual comportamiento fue descrito para la turbidez (Fig. V.75.) no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre esta mezcla y los resultados con *Ps. mendocina* y *Ps. fluorescens* aunque sí frente a *Ag. radiobacter* (Tabla V.52.). La mezcla con los tres inoculantes vuela a mejorar el incremento en la turbidez del agua tratada manifestada por *Ag. radiobacter*.

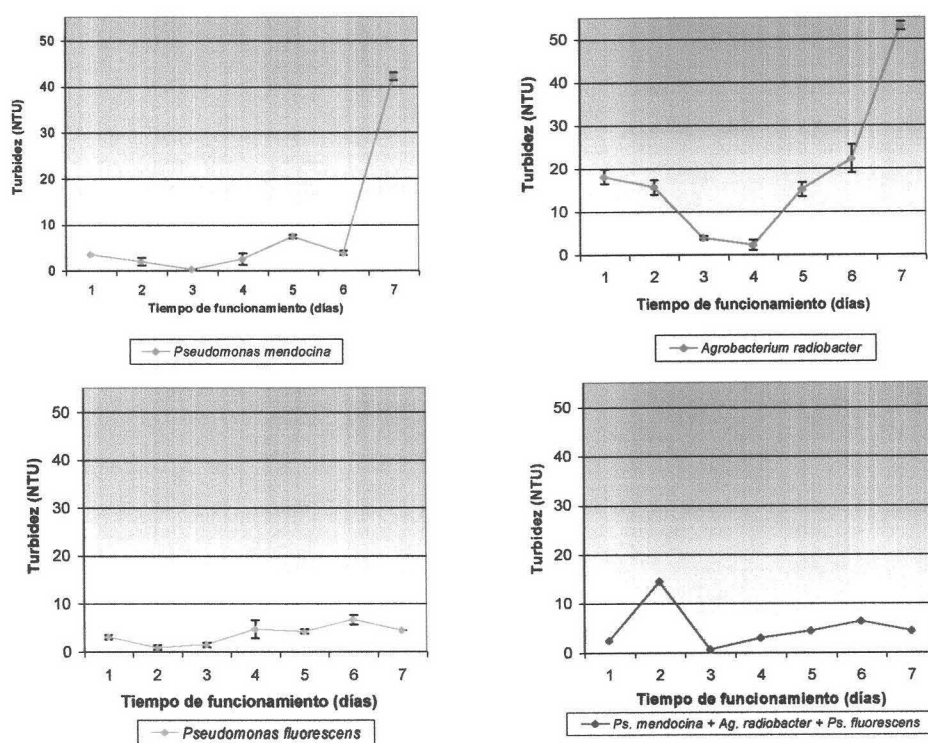


Fig. V.75. Valor diario de la turbidez en el agua de salida para *Ps. mendocina*, *Ag. radiobacter*, *Ps. fluorescens* y la mezcla de las tres. (Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Tabla V.52.- Análisis estadístico realizado para la turbidez en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 días.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	1912,48	1912,48	19,67	0,0000
Inoculantes	3	2859,87	953,289	9,80	0,0000
Total (corregido)	83	12453,9			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ps. mendocina</i>	8,89	A
<i>Ag. radiobacter</i>	18,62	B
<i>Ps. fluorescens</i>	3,63	A
Mezcla	5,15	A

La mala estabilidad de la biopelícula quedó reflejada en la presencia de microorganismos en el agua tratada (Fig. V.76.), la cual presentó valores de casi un logaritmo por encima de los obtenidos para las inoculaciones individuales existiendo diferencias estadísticamente significativas entre la mezcla y cada una de las inoculaciones individuales (Tabla V.53.).

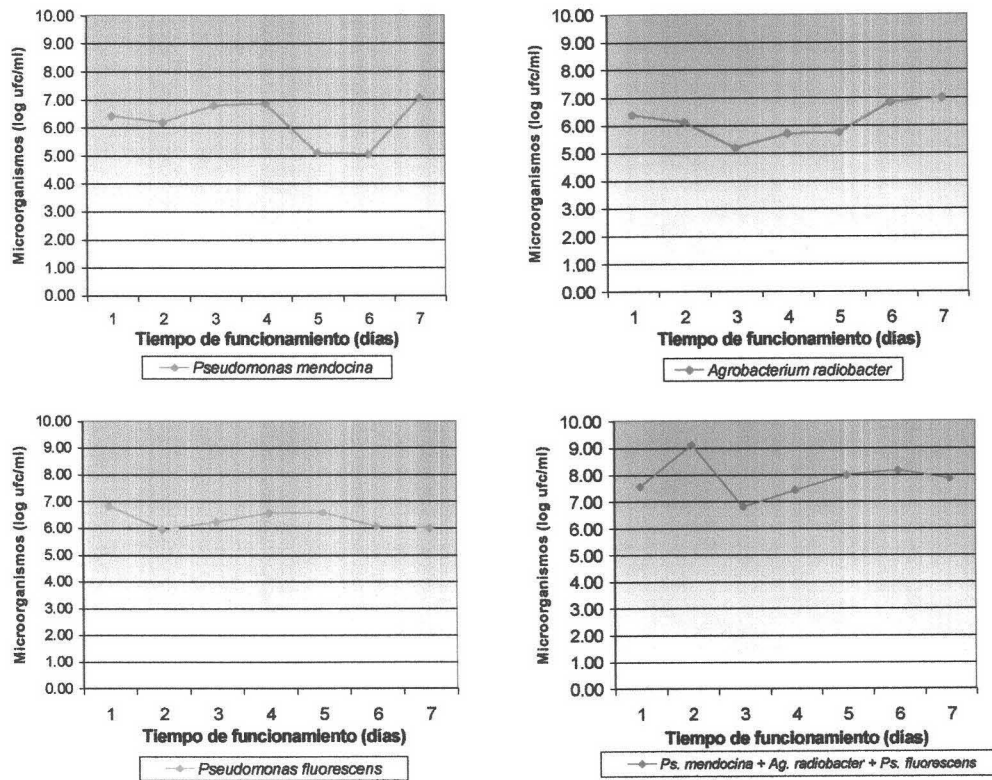


Fig. V.76. Recuento de microorganismos diario en el agua de salida para *Ps. mendocina*, *Ag. radiobacter*, *Ps. fluorescens* y la mezcla de las tres

Tabla V.53.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento.

Análisis de varianza						
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia	
Días de funcionamiento	1	$8,03 \cdot 10^{16}$	$8,03 \cdot 10^{16}$	1,55	0,2194	
Inoculantes	3	$6,00 \cdot 10^{17}$	$2,00 \cdot 10^{17}$	3,85	0,0146	
Total (corregido)	55	$3,33 \cdot 10^{18}$				

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ps. mendocina</i>	$4,11 \cdot 10^6$	A
<i>Ag. radiobacter</i>	$3,01 \cdot 10^6$	A
<i>Ps. fluorescens</i>	$2,63 \cdot 10^6$	A
Mezcla	$2,42 \cdot 10^8$	B

La mezcla realizada entre *Ps. fluorescens* con *Ps. mendocina* o *Ag. radiobacter* para inocular el sistema dieron lugar a biopelículas que mejoraban, aunque no de forma significativa, los parámetros del agua tratada con respecto a cada inoculación individual, apreciándose una mejora real en la estabilidad de la biopelícula. Estos resultados no se lograron con la mezcla de las tres cepas, dando lugar a biopelículas menos estables y por ello a peores rendimientos en eliminación de nitrógeno. Este sistema no mejoró la inoculación individual realizada con *Ag. radiobacter*.

V.6.2.4.- Resultados de la mezcla *Pseudomonas mendocina* y *Agrobacterium radiobacter*

a) Sobre las muestras de relleno

Las mezclas de *Ps. fluorescens* con *Ps. mendocina* o *Ag. radiobacter* daban lugar a biopelículas más estables que cada una de ellas por separado, razón por la cual la mezcla de las tres cepas podría suponer obtener una biopelícula más estable también. Sin embargo, no se dieron estos resultados, debido posiblemente a una incompatibilidad entre *Ps. mendocina* y *Ag. radiobacter*, lo cual se comprobó al ensayar la mezcla de ambas ya que se obtuvo una biopelícula con menor densidad bacteriana que la formada para cada uno de los ensayos individuales, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre la mezcla y cada uno de los ensayos por separado (Tabla V.54.).

Tabla V.54.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el relleno tras la recirculación para los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Inoculantes	2	$3,45 \cdot 10^{19}$	$1,72 \cdot 10^{19}$	10291,94	0,0000
Total (corregido)	5	$3,45 \cdot 10^{19}$			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ps. mendocina</i>	$3,19 \cdot 10^9$	A
<i>Ag. radiobacter</i>	$6,12 \cdot 10^9$	B
Mezcla	$2,48 \cdot 10^8$	C

Esta biopelícula, al igual que le sucedía a la formada con *Ps. mendocina* perdía densidad bacteriana (Fig. V.77.) tras el paso del flujo del agua, siendo los valores obtenidos estadísticamente semejantes a los de *Ps. mendocina* (Tabla V.55.).

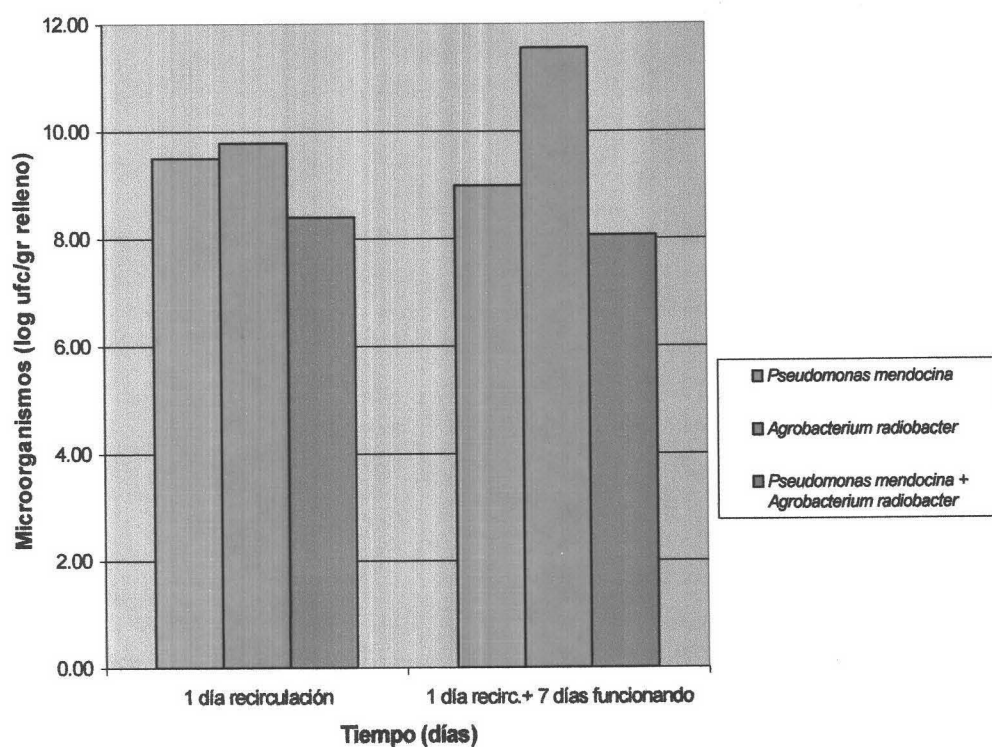


Fig.V.77. Recuentos microorganismos en el relleno para *Pseudomonas mendocina*, *Agrobacterium radiobacter* y la mezcla de ambas.

Tabla V.55.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el relleno tras el funcionamiento para los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Inoculante	2	$1,67 \cdot 10^{23}$	$8,38 \cdot 10^{22}$	10,57	0,0438
Total (corregido)	5	$1,91 \cdot 10^{23}$			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ps. mendocina</i>	$9,62 \cdot 10^8$	A
<i>Ag. radiobacter</i>	$3,55 \cdot 10^{11}$	B
Mezcla	$1,14 \cdot 10^8$	A

Esta pérdida en densidad bacteriana se vió también reflejada en la actividad desnitrificante, la cual tras la recirculación a pesar de existir diferencias estadísticamente significativas entre cada caso presentó valores más acordes con *Ps. mendocina* (Tabla V.56.), descendiendo posteriormente tras el paso del agua a tratar (Fig. V. 77.).

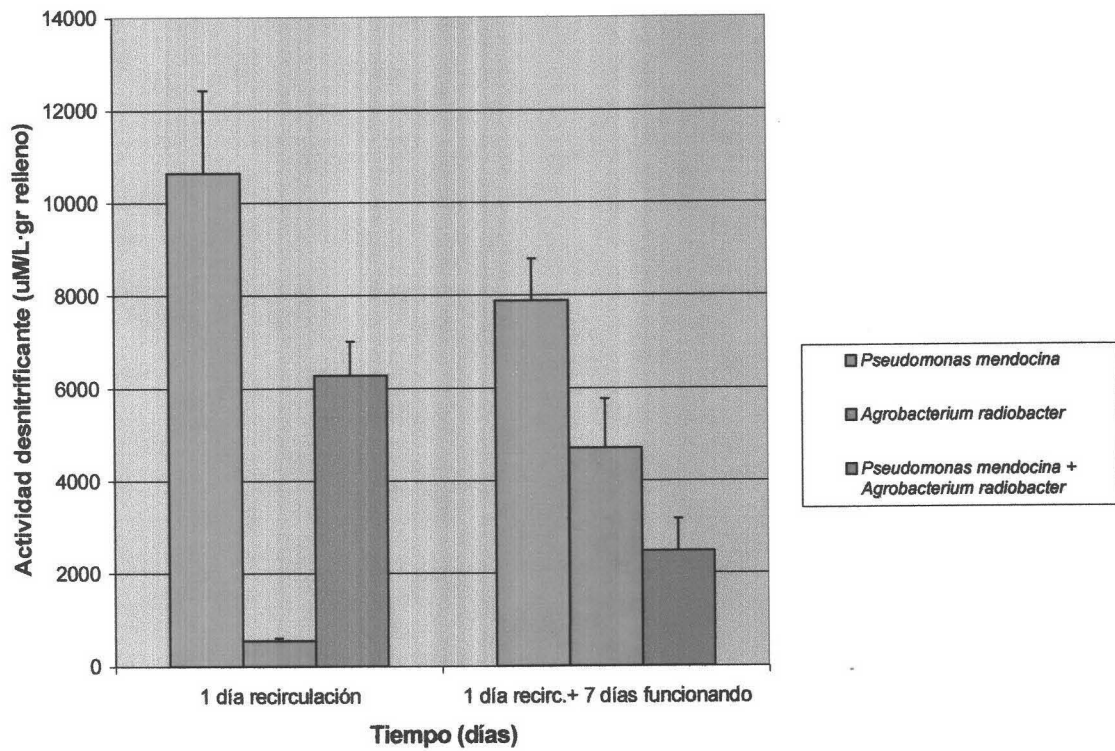


Fig.V.78. Actividad desnitrificante para *Pseudomonas mendocina*, *Agrobacterium radiobacter* y la mezcla de ambas.

(Las barras representan la media ±desviación estándar)

Tabla V.56.- Análisis estadístico realizado para la actividad desnitrificante en el relleno tras la recirculación para los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Inoculantes	2	1,02*10 ⁸	5,12*10 ⁷	41,29	0,0066
Total (corregido)	5	1,06*10 ⁸			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ps. mendocina</i>	10645	A
<i>Ag. radiobacter</i>	552	B
Mezcla	6276	C

La actividad desnitrificante fue estadísticamente diferente a la presentada por cada inoculante individual tras el funcionamiento del sistema, siendo mucho menor para la mezcla (Tabla V.57.). Estos resultados ponen de manifiesto la poca estabilidad de la biopelícula cuyo comportamiento fue semejante al presentado por *Ps. mendocina*.

Tabla V.57.- Análisis estadístico realizado para la actividad desnitrificante en el relleno tras el funcionamiento para los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Inoculantes	2	$2,95 \cdot 10^7$	$1,47 \cdot 10^7$	18,18	0,0210
Total (corregido)	5	$3,19 \cdot 10^7$			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ps. mendocina</i>	7875	A
<i>Ag. radiobacter</i>	4705	B
Mezcla	2471	B

b) Resultados sobre las muestras de agua

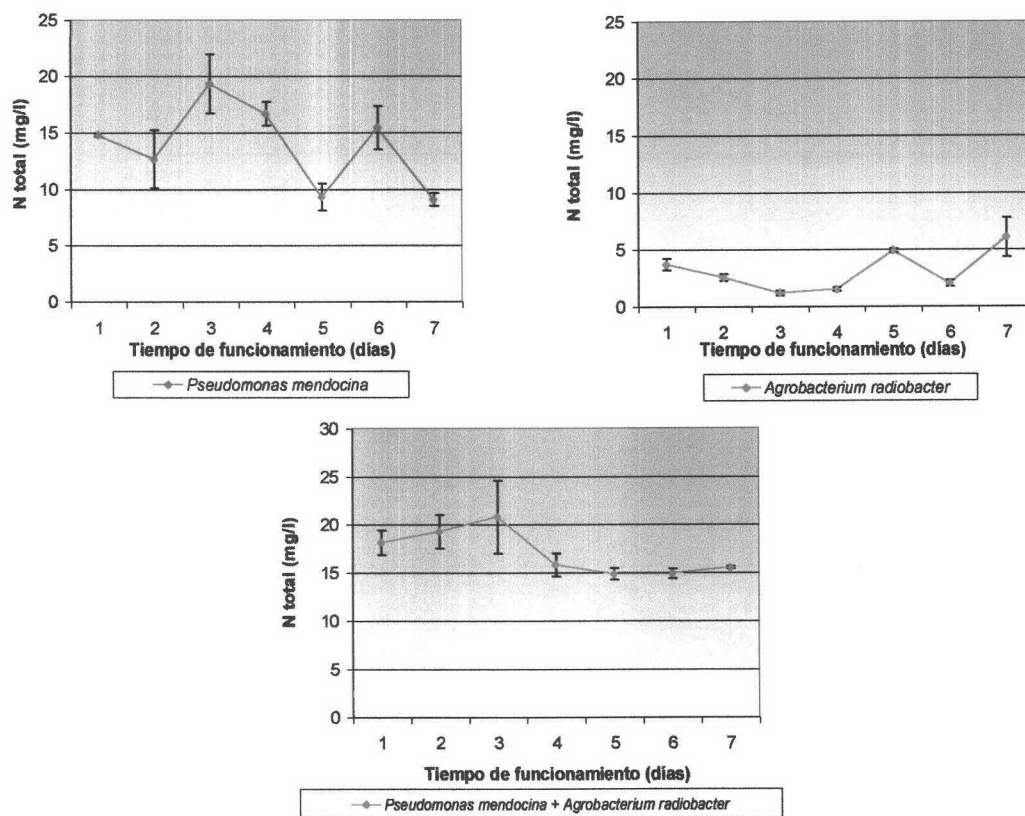


Fig. V.79. Nitrógeno total diario en el agua de salida para *Pseudomonas mendocina*, *Agrobacterium radiobacter* y la mezcla de ambas.

(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Los rendimientos obtenidos con esta mezcla de inoculantes no lograba valores finales de concentración de nitrógeno acordes con las exigencias legislativas (Figura V.79.) al igual que sucedía para la inoculación realizada con *Ps. mendocina*. No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre la mezcla y la inoculación con *Ps. mendocina* (Tabla V.58.), estando estos valores acordes con una biopelícula poco estable.

Tabla V.58.- Análisis estadístico realizado para la concentración de nitrógeno total en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 días.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	42,505	42,505	5,38	0,0239
Inoculantes	2	2240,63	1120,32	141,73	0,0000
Total (corregido)	62	2749,52			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ps. mendocina</i>	13,90	A
<i>Ag. radiobacter</i>	3,13	B
Mezcla	17,06	C

En lo que respecta a la concentración final de nitrito en el agua tratada su comportamiento fue análogo al de *Ps. mendocina*, dando concentraciones altas que obligan a tratamientos posteriores del agua (Figura V.80.).

No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de nitrito obtenidas con la mezcla y *Ps. mendocina* (Tabla V.59.).

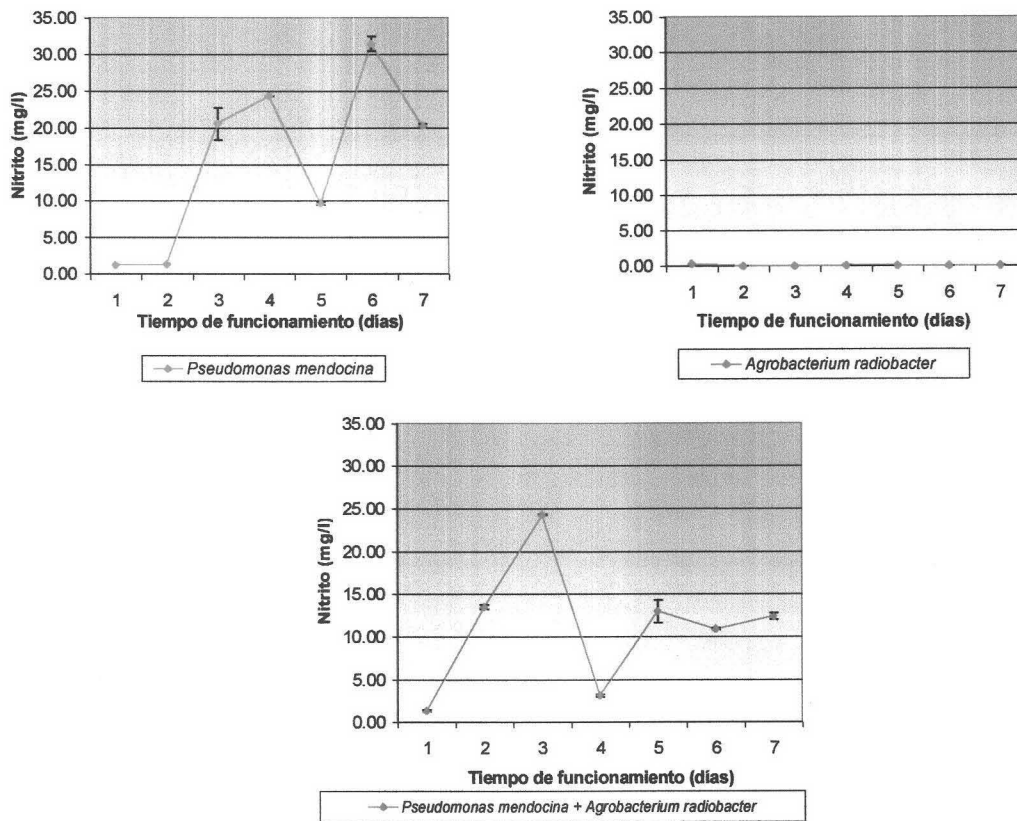


Fig. V.80. Concentración de nitrito diaria en el agua de salida para *Pseudomonas mendocina*, *Agrobacterium radiobacter* y la mezcla de ambas.

(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Tabla V.59.- Análisis estadístico realizado para la concentración de nitrito en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	538,712	538,712	10,71	0,0018
Inoculantes	2	2665,53	1332,76	26,51	0,0000
Total (corregido)	62	6170,72			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ps. mendocina</i>	15,53	A
<i>Ag. radiobacter</i>	0,08	B
Mezcla	11,18	A

El valor medio de turbidez presentado por las muestras de agua obtenidas tras el proceso (Figura V.81.) indicaba que se precisan de tratamientos posteriores al superar las 6 NTU exigidas por la legislación en cuanto a turbidez, sin embargo nunca se

registraron los valores manifestados en los ensayos de *Ag. radiobacter*, siendo su comportamiento semejante al de *Ps. mendocina* (Tabla V.60.).

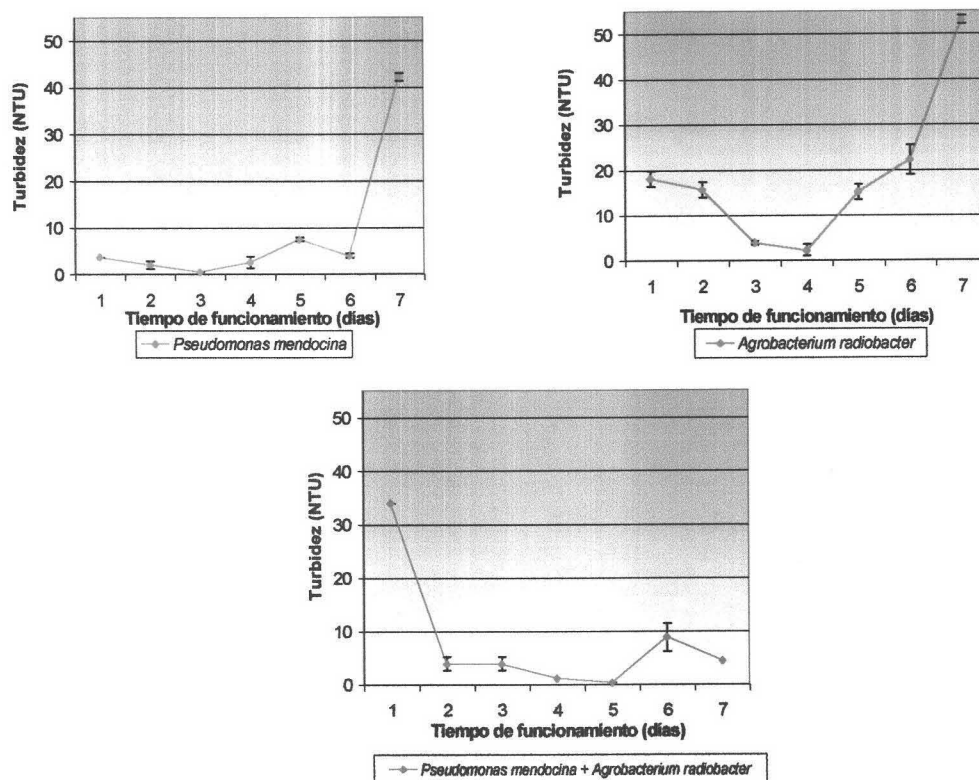


Fig. V.81. Valor diario de la turbidez en el agua de salida para *Pseudomonas mendocina*, *Agrobacterium radiobacter* y la mezcla de ambas.
(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Tabla V.60.- Análisis estadístico realizado para la turbidez en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 días.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	1074,87	1074,87	6,01	0,0172
Inoculantes	2	1448,7	724,352	4,05	0,0225
Total (corregido)	62	13081,7			
Test t de Student (P<0.05)					
Inoculante	Media	Grupo			
<i>Ps. mendocina</i>	8,89	A			
<i>Ag. radiobacter</i>	18,62	B			
Mezcla	8,08	A			

La presencia de microorganismos en el agua tratada fue semejante en la mezcla y en las inoculaciones individuales (Figura V.82.), no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre cada uno de los ensayos (Tabla V.61.). Estos valores obligaban en todo caso a un tratamiento de desinfección final.

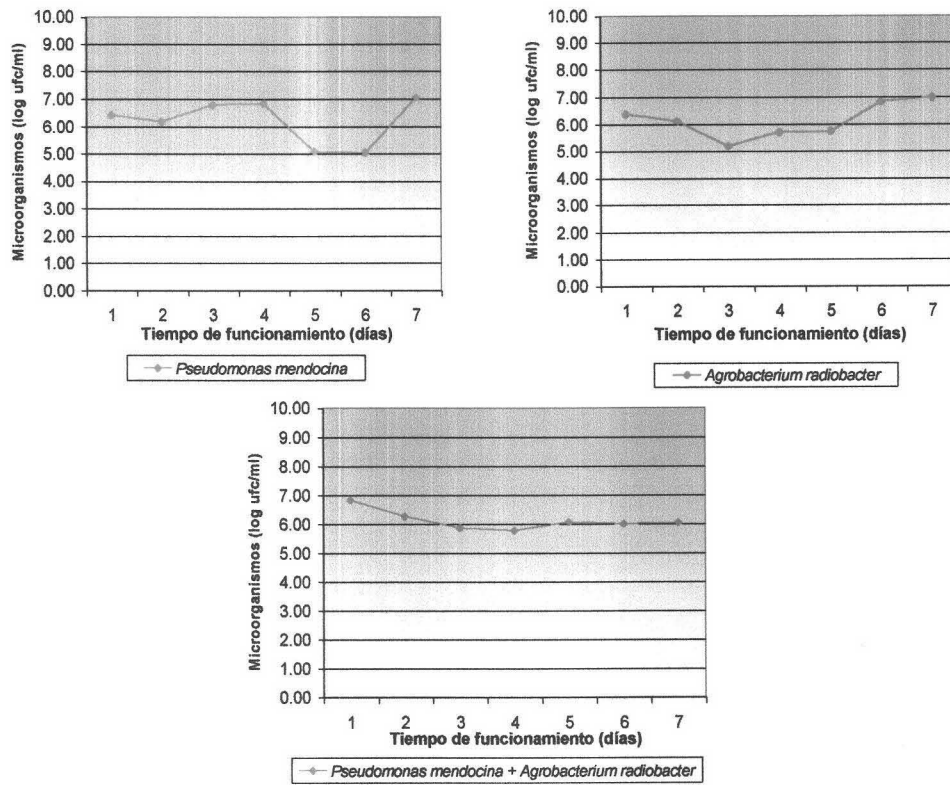


Fig. V.82. Recuento de microorganismos diario en el agua de salida para *Pseudomonas mendocina*, *Agrobacterium radiobacter* y la mezcla de ambas.

Tabla V.61.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento.

Análisis de varianza						
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia	
Días de funcionamiento	1	$2,55 \cdot 10^{13}$	$2,55 \cdot 10^{13}$	2,40	0,1293	
Inoculantes	2	$3,59 \cdot 10^{13}$	$1,80 \cdot 10^{13}$	1,69	0,1972	
Total (corregido)	41	$4,64 \cdot 10^{14}$				
Test t de Student (P<0.05)						
Inoculante	Media	Grupo				
<i>Ps. mendocina</i>	$4,11 \cdot 10^6$	A				
<i>Ag. radiobacter</i>	$3,01 \cdot 10^6$	A				
Mezcla	$1,85 \cdot 10^6$	A				

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto un comportamiento análogo entre el cultivo de *Ps. mendocina* y la mezcla, lo cual puede implicar un efecto de inhibición de esta cepa frente a *Ag. radiobacter*, efecto que en ningún momento pareció afectarle a la cepa *Ps. fluorescens*. Estos resultados pueden explicar los malos rendimientos obtenidos para la mezcla de *Ps. mendocina*, *Ps. fluorescens* y *Ag. radiobacter*.

V.6.2.5.- Resultados de la mezcla *Agrobacterium radiobacter* y *Pseudomonas picketii*

a) Sobre las muestras de relleno

La densidad bacteriana de la mezcla entre *Ps. picketii* y *Ag. radiobacter* fue análoga a la mostrada por la inoculación única con *Ps. picketii*, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos ensayos (Tabla V.62.). Esta densidad descendió tras la puesta en marcha del sistema al igual que sucedió con *Ps. picketii* (Figura V.83.).

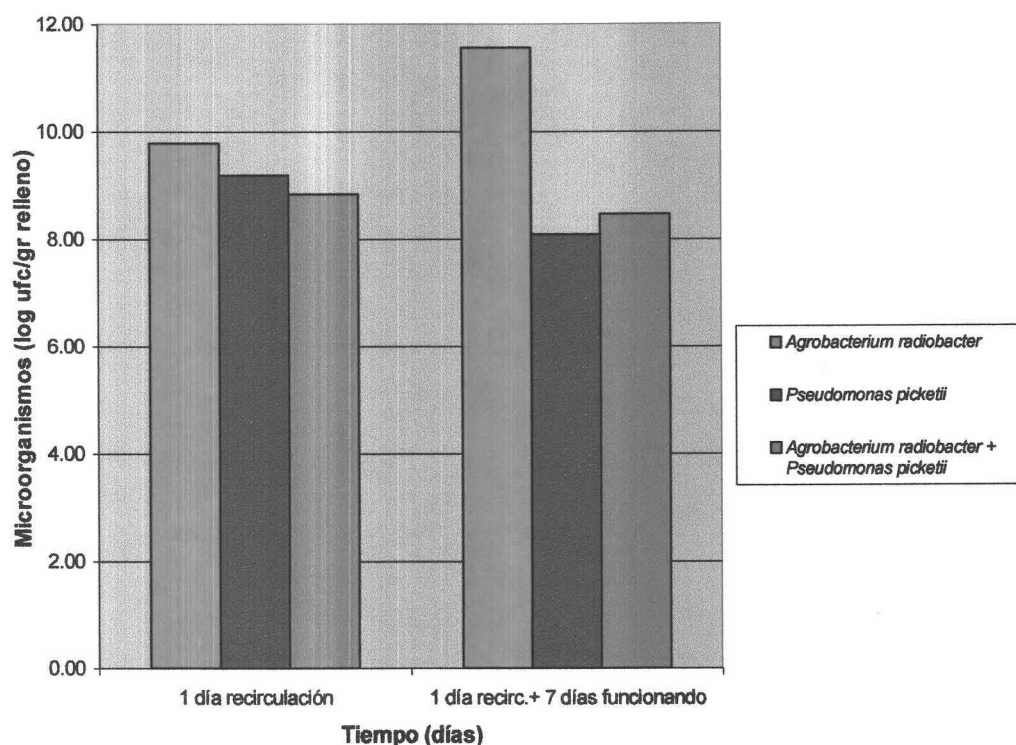


Fig.V.83. Recuentos microorganismos en el relleno para *Ag. radiobacter*, *Ps. picketii* y la mezcla de ambas.

Tabla V.62.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el relleno tras la recirculación para los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Inoculantes	2	$3,42 \cdot 10^{19}$	$1,71 \cdot 10^{19}$	11542,16	0,0000
Total (corregido)	5	$3,42 \cdot 10^{19}$			
Test t de Student (P<0.05)					
Inoculante	Media	Grupo			
<i>Ag. radiobacter</i>	$6,12 \cdot 10^9$	A			
<i>Ps. picketii</i>	$1,53 \cdot 10^9$	B			
Mezcla	$6,85 \cdot 10^8$	B			

Los valores de densidad bacteriana tras la puesta en marcha del sistema fueron análogos entre la mezcla y *Ps. picketii*, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre éstos y los ensayos con *Ag. radiobacter* (Tabla V.63.).

Tabla V.63.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el relleno tras el funcionamiento para los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Inoculantes	2	$1,68 \cdot 10^{23}$	$8,39 \cdot 10^{22}$	10,60	0,0437
Total (corregido)	5	$1,92 \cdot 10^{23}$			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ag. radiobacter</i>	$3,55 \cdot 10^{11}$	A
<i>Ps. picketii</i>	$1,19 \cdot 10^8$	B
Mezcla	$2,90 \cdot 10^8$	B

Este comportamiento reflejaba una situación análoga a la obtenida para la mezcla entre *Ag. radiobacter* y *Ps. mendocina*, sin embargo los valores de actividad desnitrificante fueron mayores tal como se refleja en la Figura V.84. Para este ensayo no se registraron analogías estadísticas con ninguna de las inoculaciones individuales ni tras la recirculación ni tras el funcionamiento del biofiltro (Tablas V.64. y V.65.).

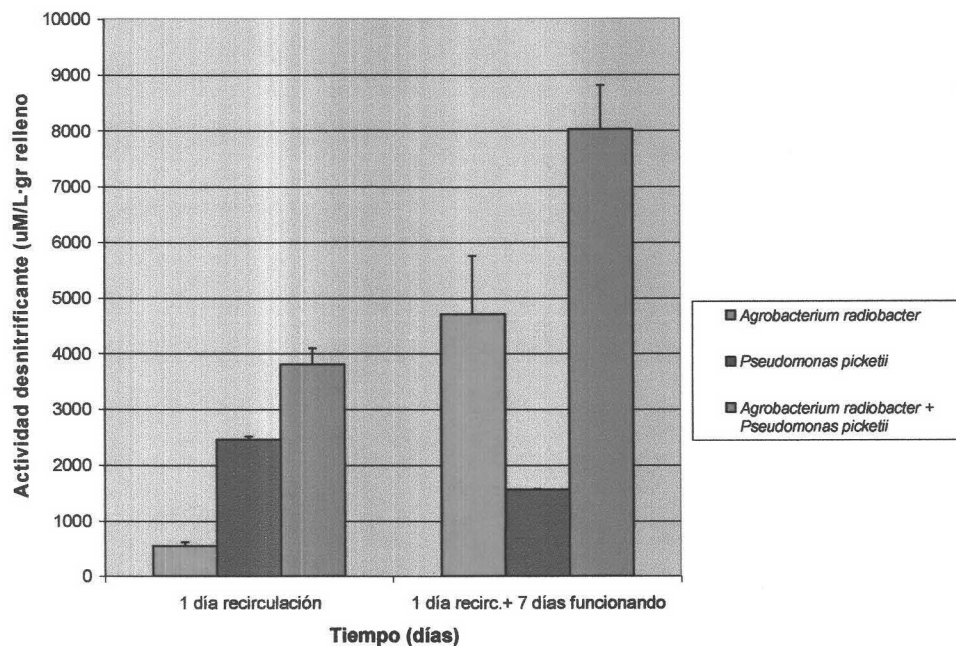


Fig.V.84. Actividad desnitrificante para *Ag. radiobacter*, *Ps. picketii* y la mezcla de ambas.

(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Tabla V.64.- Análisis estadístico realizado para la actividad desnitrificante en el relleno tras la recirculación para los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza						
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia	
Inoculantes	2	$1,07 \cdot 10^7$	$5,35 \cdot 10^6$	173,61	0,0008	
Total (corregido)	5	$1,07 \cdot 10^7$				

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ag. radiobacter</i>	552	A
<i>Ps. picketii</i>	2464	B
Mezcla	3806	C

Tabla V.65.- Análisis estadístico realizado para la actividad desnitrificante en el relleno tras el funcionamiento para los diferentes inoculantes empleados.

Análisis de varianza						
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia	
Inoculantes	2	$4,19 \cdot 10^7$	$2,09 \cdot 10^7$	36,21	0,0079	
Total (corregido)	5	$1,73 \cdot 10^6$				

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ag. radiobacter</i>	4705	A
<i>Ps. picketii</i>	1561	B
Mezcla	8030	C

b) Resultados sobre las muestras de agua

Los rendimientos medios obtenidos con la mezcla fueron superiores a las exigencias legislativas siendo más parecidos a los presentados por *Ps. picketii* que a los de *Ag. radiobacter* (Figura V.85.). Este comportamiento homólogo queda reflejado en el análisis estadístico no existiendo diferencias significativas entre ambos ensayos y sí con respecto a *Ag. radiobacter* (Tabla V.66.).

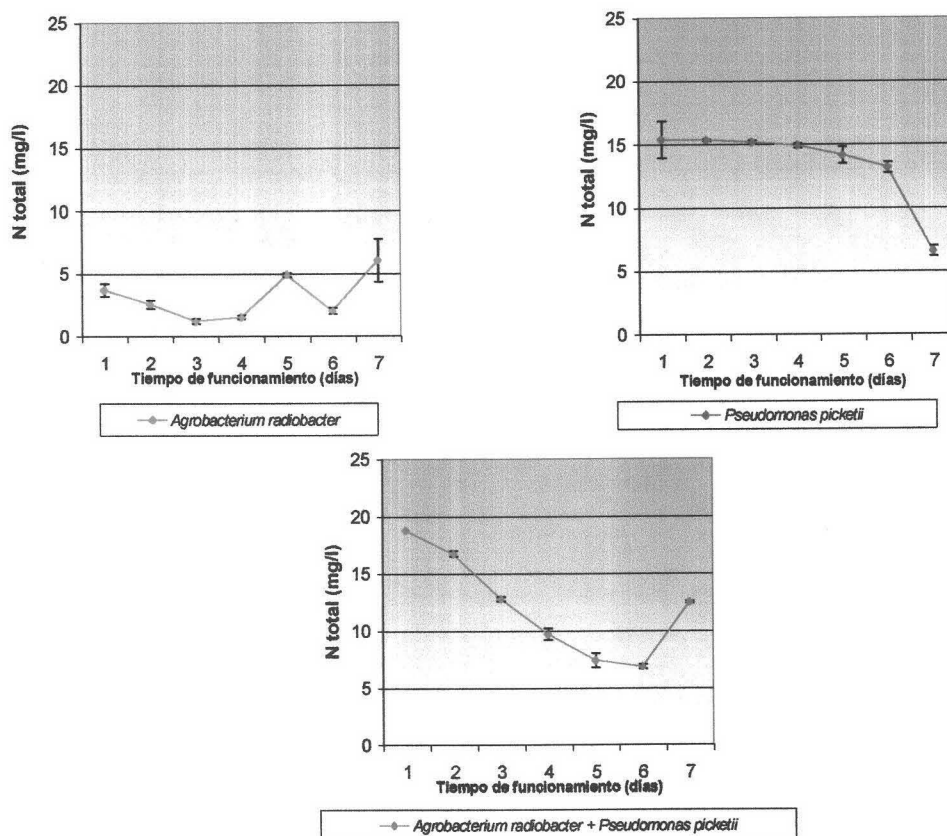


Fig. V.85. Nitrógeno total diario en el agua de salida para *Agrobacterium radiobacter*, *Pseudomonas picketii* y la mezcla de ambas.
(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Tabla V.66.- Análisis estadístico realizado para la concentración de nitrógeno total en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 días.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	157,118	157,118	19,90	0,0000
Inoculantes	2	1334,79	667,396	84,54	0,0000
Total (corregido)	62	1957,65			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ag. radiobacter</i>	3,13	A
<i>Ps. picketii</i>	13,53	B
Mezcla	12,10	B

Al igual que sucedía con el rendimiento total, la presencia de nitrito en el agua tratada fue semejante a los valores obtenidos con el ensayo de *Ps. picketii* (Figura V.86.), siendo estos valores estadísticamente diferentes a los obtenidos para la inoculación con *Ag. radiobacter* (Tabla V.67.). Los valores alcanzados oscilan entre 5 y 10 mg/l, muy por encima de las exigencias legislativas, precisándose tratamientos de oxidación para eliminar su concentración, lo cual no fue necesario para el caso de la inoculación con *Ag. radiobacter*.

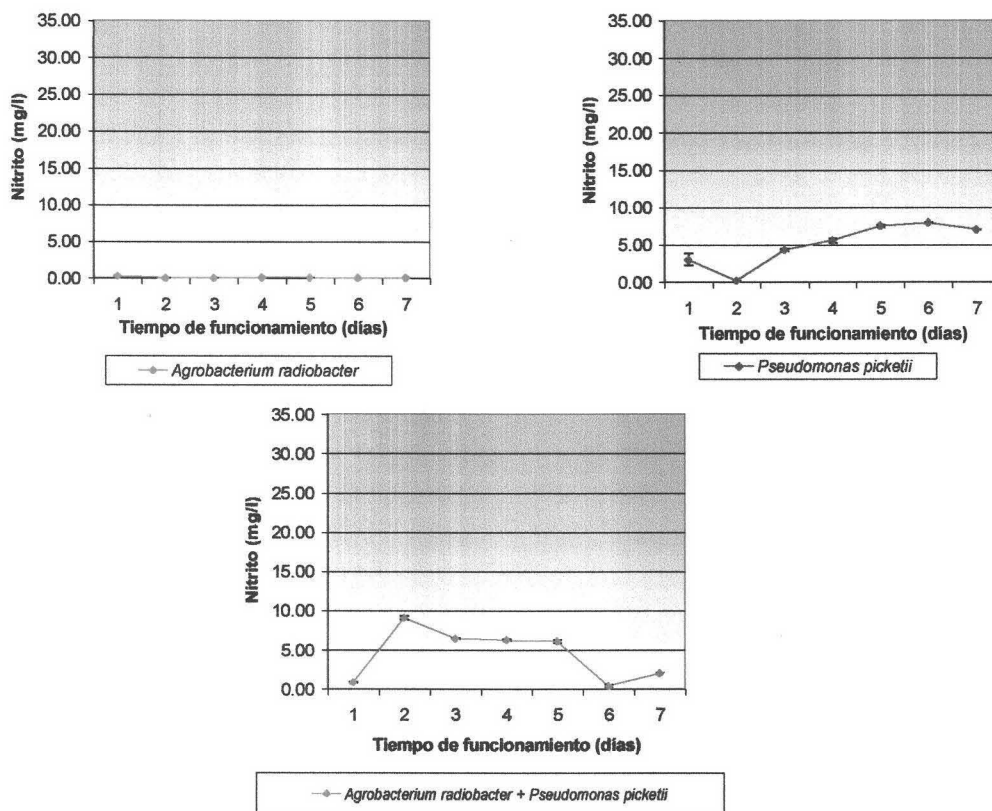


Fig. V.86. Concentración de nitrito diaria en el agua de salida para *Agrobacterium radiobacter*, *Pseudomonas picketii* y la mezcla de ambas.

(Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Tabla V.67.- Análisis estadístico realizado para la concentración de nitrito en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	9,192	9,192	1,62	0,2086
Inoculantes	2	311,619	155,81	27,39	0,0000
Total (corregido)	62	656,424			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ag. radiobacter</i>	0,08	A
<i>Ps. picketii</i>	5,08	B
Mezcla	4,45	B

Al igual que para la mezcla entre *Ps. mendocina* y *Ag. radiobacter*, se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre la mezcla y el ensayo con *Ag. radiobacter* (Tabla V.68.), aunque los valores obtenidos semejantes a los de *Ps. picketii* no precisaban de tratamientos para su corrección, siendo en todo caso inferiores a 6 NTU.

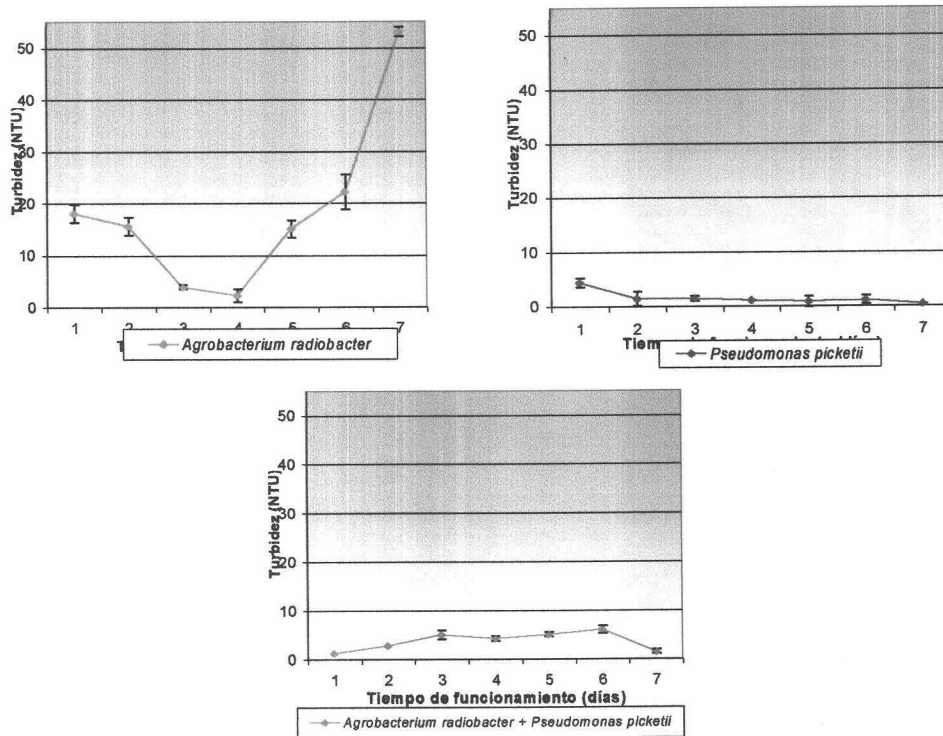


Fig. V.87. Valor diario de la turbidez en el agua de salida para *Agrobacterium radiobacter*, *Pseudomonas picketii* y la mezcla de ambas. (Las barras representan la media \pm desviación estándar)

Tabla V.68.- Análisis estadístico realizado para la turbidez en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 días.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	542,168	542,168	6,76	0,0117
Inoculantes	2	3633,03	1816,52	22,66	0,0000
Total (corregido)	62	8904,63			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ag. Radiobacter</i>	18,62	A
<i>Ps. picketii</i>	1,56	B
Mezcla	3,66	B

Al igual que para el resto de ensayos de inoculación la presencia de microorganismos en el agua de salida fue análoga entre ellos (Fig. V.88.), obligando a un tratamiento de desinfección del agua tratada.

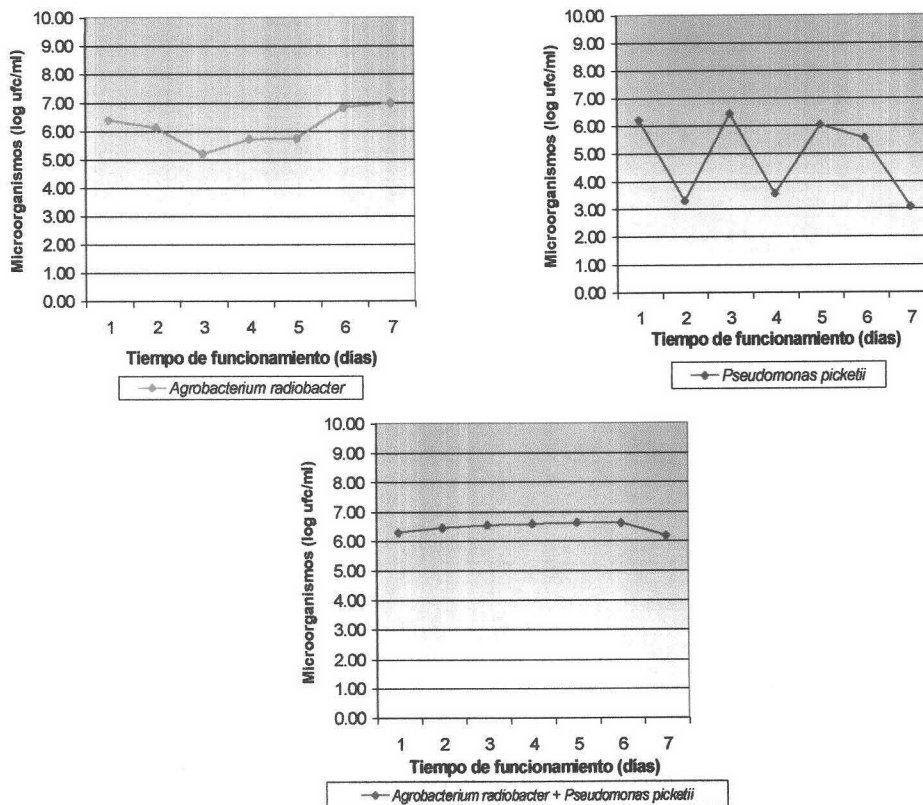


Fig. V.88. Recuento de microorganismos diario en el agua de salida para *Agrobacterium radiobacter*, *Pseudomonas picketii* y la mezcla de ambas.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre cada uno de los ensayos, tal como muestra la tabla V.69.

Tabla V.69.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento.

Análisis de varianza					
Fuente de variación	g.l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significancia
Días de funcionamiento	1	$2,30 \cdot 10^{13}$	$2,30 \cdot 10^{13}$	4,60	0,0385
Inoculantes	2	$4,04 \cdot 10^{13}$	$2,02 \cdot 10^{13}$	4,03	0,0560
Total (corregido)	41	$2,51 \cdot 10^{14}$			

Test t de Student (P<0.05)		
Inoculante	Media	Grupo
<i>Ag. radiobacter</i>	$3,01 \cdot 10^6$	A
<i>Ps. picketii</i>	$8,30 \cdot 10^5$	A
Mezcla	$3,09 \cdot 10^6$	A

Los resultados obtenidos se corresponden con un comportamiento semejante al manifestado para la mezcla entre *Ps. mendocina* y *Ag. radiobacter*, donde la actividad del segundo parece quedar eclipsada por la de la especie de *Pseudomonas*. Nuevamente nos encontramos con una incompatibilidad entre cepas donde una cepa aparentemente incapaz de formar biopelículas estables frena la posibilidad de hacerlo a otra que por sí sola sí las obtiene.

V.6.3.- Conclusiones previas

Una vez comparados los resultados presentados en las plantas inoculadas con la mezcla de cepas seleccionadas con los obtenidos en las plantas inoculadas con las mismas cepas pero de forma aislada, se pueden obtener las siguientes conclusiones:

- La inoculación realizada con la mezcla *Ps. mendocina* y *Ps. fluorescens* no mejoró prácticamente el funcionamiento del sistema respecto a la inoculación realizada con cada una de las cepas de forma aislada, aunque la biopelícula formada sea algo más estable. No se llegaron a obtener resultados óptimos en eliminación de nitrógeno total.
- La inoculación realizada con la mezcla *Ag. radiobacter* y *Ps. fluorescens* mejoró el funcionamiento del sistema respecto a la inoculación realizada con *Ps. fluorescens*, pero no con respecto a la inoculación realizada con *Ag. radiobacter* que fue con la que se obtuvo el mayor rendimiento en eliminación de nitrógeno total. Únicamente la mezcla mejoró el parámetro de turbidez en el agua de salida, lo cual indica que gracias a la mayor producción de EPS por parte de la cepa *Ps. fluorescens* la biopelícula formada se adhirió mejor al relleno que la biopelícula formada con *Ag. radiobacter* de forma aislada.
- La inoculación realizada con la mezcla *Ps. mendocina*, *Ag. radiobacter* y *Ps. fluorescens* no ofreció mejoras con respecto a la inoculación realizada únicamente con las cepas de forma aislada. Solamente se mejoró el parámetro de la turbidez en el agua de salida obtenido para la inoculación realizada con *Ag. radiobacter*, gracias a que la biopelícula formada se adhirió mejor al relleno. No se alcanzaron rendimientos óptimos del funcionamiento del sistema para la mezcla, pues el rendimiento en eliminación de nitrógeno total era inferior al 50%.
- La inoculación realizada con la mezcla *Ps. mendocina* y *Ag. radiobacter* no presentó prácticamente ninguna ventaja en el funcionamiento del sistema con respecto a las inoculaciones realizadas con cada una de las cepas de forma individual.

- La inoculación realizada con la mezcla *Ps. mendocina*, *Ag. radiobacter* y *Ps. pickettii* ofreció mejores resultados que si se realiza la inoculación de forma individual con *Ps. mendocina* o con *Ps. pickettii*, pero no frente a la inoculación realizada con *Ag. radiobacter*, que es para la cual se dieron los mejores rendimientos del sistema.
- La inoculación realizada con la mezcla de las cepas *Ag. radiobacter* y *Ps. pickettii* no presentó prácticamente ninguna ventaja en el funcionamiento del sistema con respecto a las inoculaciones realizadas con cada una de las cepas de forma individual, dándose nuevamente los mejores resultados para la inoculación realizada con *Ag. radiobacter*.

Por tanto, como puede comprobarse, al realizar el proceso de formación de biopelícula con la mezcla de cepas seleccionadas de forma que tengamos alta actividad desnitrificante y alta capacidad de producción de EPS no se mejoró en la mayoría de los casos los resultados obtenidos con la inoculación realizada de forma individual, sin obtenerse rendimientos óptimos para el funcionamiento del sistema.

Así pues, la inoculación del sistema empleando mezclas de los inoculantes, pensando en una combinación de las características aportadas por cada microorganismo, no ofrecía ventaja alguna en el proceso con respecto al uso de un solo inoculante. En la formación de estas biopelículas mixtas se apreció una influencia negativa de unos microorganismos frente a otros, debido a que las bacterias componentes de las biopelículas presentan mecanismos de defensa para evitar la presencia de otros microorganismos competidores, tales como la producción de bacteriacinas. Igualmente la producción de moléculas del “Quorum-sensing” como la homoserina lactona descrita para *Pseudomonas fluorescens* (Watnick and Kolter, 2000) limita el crecimiento poblacional en estas estructuras biológicas, quedando por lo tanto reducida la actividad desnitrificante.

En ninguna de las mezclas ensayadas se mejoró el resultado obtenido para la inoculación realizada de forma individual con *Ag. radiobacter*. Únicamente se mejoraba el parámetro de la turbidez si se realizaba la mezcla con *Ps. fluorescens*, pero el

rendimiento en eliminación de nitrógeno total disminuía. Así pues, seleccionando esta cepa para la inoculación se mejorarán los parámetros de diseño de los filtros sumergidos para la desnitrificación de aguas subterráneas, aunque será necesario aplicar tratamientos posteriores para potabilizar el agua.

La inoculación selectiva de procesos de biopelícula, destinados al tratamiento de agua subterránea contaminada con nitrato, permitió obtener sistemas de cultivo fijo ricos en un microorganismo con alta actividad desnitrificante, evitando a priori la presencia de otras bacterias que pudieran alterar las características finales del efluente. La selección de inoculante fue crucial, precisándose una bacteria con alta capacidad de colonizar el material soporte y que a su vez permita obtener rendimientos óptimos para el funcionamiento del sistema. Estos aspectos se alcanzaron al emplear la cepa *Agrobacterium radiobacter* como inoculante.

VI.- INVESTIGACIÓN DE FONDO

VI.- INVESTIGACIÓN DE FONDO

El cultivo puro seleccionado para inocular el filtro sumergido fue *Agrobacterium radiobacter*, tal y como se indicó en el apartado V.6.3. de la investigación de choque, ya que fue la cepa bacteriana con la que se alcanzaron los mejores rendimientos en el funcionamiento del sistema.

La clasificación taxonómica del microorganismo fue realizada mediante pruebas bioquímicas, lo cual no es determinativo a la hora de clasificar una bacteria pues se cuenta con un 25% de error. La aplicación de este microorganismo en un filtro sumergido para el tratamiento de agua que posteriormente tendrá uso de potable, exige un conocimiento completo del tipo de bacteria que se trata.

Todo tratamiento biológico aplicado en aguas de abastecimiento, exige contar con unas garantías máximas de que se trata de un proceso donde los microorganismos empleados no presenten problemas de salud pública, tanto en lo que respecta a los consumidores como a las personas encargadas de manipular el sistema. Esto obliga a contar con la mayor seguridad posible de que la bacteria empleada no es patógena humana ni patógena para animales y plantas, por lo que la caracterización del microorganismo debe ser exacta

Esta idea llevó a realizar una clasificación taxonómica de la bacteria basada en pruebas de homología de RNA (técnica desarrollada en el apartado IV.- Materiales y métodos), las cuales presentan un 99% de fiabilidad. Los datos obtenidos en estos ensayos fueron corroborados con los desprendidos de las pruebas bioquímicas realizadas con anterioridad, asegurándonos de este modo que se trata de un microorganismos concreto.

Los resultados de estos ensayos mostraron una clasificación taxonómica de la bacteria que difería de la encontrada en un principio (*Ag. radiobacter*), quedando catalogada como *Hydrogenophaga pseudoflava*. Esta bacteria no se conoce como patógena, lo cual reduce considerablemente los problemas sanitarios que podrían derivarse de esto.

Realizada la selección del microorganismo se procedió a **estudiar los parámetros de diseño para el filtro sumergido, buscando una mejora** respecto a los obtenidos en investigaciones anteriores en las que el sistema se inoculaba con licor mezcla procedente de reactores biológicos de fangos activos de una estación depuradora (Gómez, M.A., 1998), que permitía la formación de una biopelícula activa en cuya composición destacaban microorganismos patógenos y tan solo un 30% de bacterias desnitrificantes. Esto llevó a pensar que un proceso de inoculación selectiva, para lo cual se emplearían cepas desnitrificantes con alta actividad y gran capacidad de adherencia, mejoraría los rendimientos reduciendo así mismo costes tanto de 1ª instalación como de explotación, al mejorar los parámetros de diseño del filtro biológico y facilitar la fase de explotación del sistema, minimizando el consumo de reactivos (objetivo de la investigación).

VI.1.- DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA PILOTO A ESCALA SEMI-TÉCNICA

Para realizar el estudio de la mejora de los parámetros de diseño de un filtro sumergido aplicado a la desnitrificación de aguas subterráneas se empleó una planta a escala semi-técnica (Fig. VI.1.), la cual fue utilizada anteriormente para el diseño mediante inoculación con licor mezcla. La planta experimental estaba situada en la Estación Depuradora Granada Oeste (Puente de los Vados), lugar en el que podía contar con una captación de agua subterránea con alta concentración de nitrato.

El filtro biológico consistía en un cilindro de metacrilato de 30 cm de diámetro conectado al tubo de entrada fabricado en PVC, formando ambos un sistema de vasos comunicantes, lo cual permitía mantener el sistema inundado (Fig. VI.2.). El cilindro central, estaba formado por tres cuerpos iguales unidos entre sí por bridas (Fig. VI.3.). En la parte baja del filtro se incorporó un falso fondo a través del cual se introducía el agua mediante cuatro difusores en el cilindro central. De este modo se evitaba la formación de caminos preferenciales en la entrada de agua.

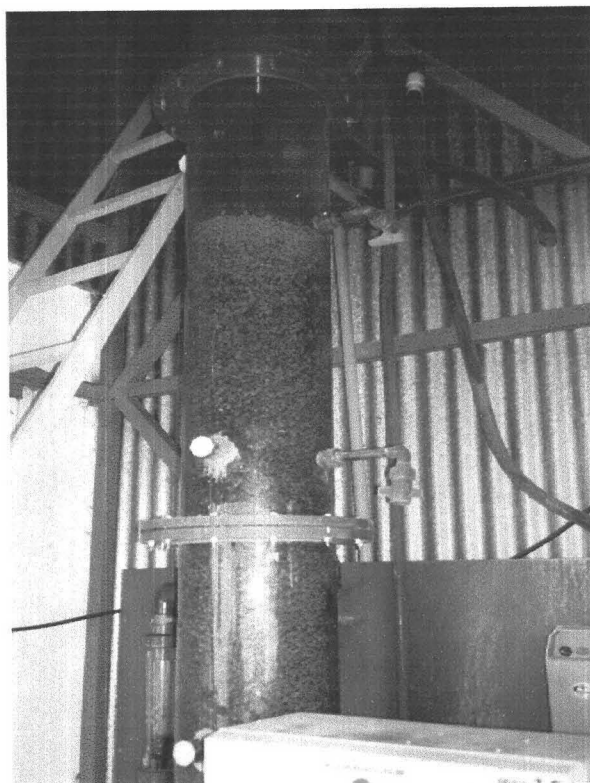


Fig. VI.1. Filtro biológico a escala semi-técnica empleado en la investigación de fondo.

El cilindro, unido a una mesa que actuaba como base y soportado sobre una estructura metálica para evitar su rotura por tracción, estaba completamente cubierto mediante un forro opaco, evitando así la incidencia de la luz solar sobre el interior de la columna. Se evitaba de esta forma una proliferación masiva de algas en el interior del biofiltro, problema que podría desarrollar al contar el agua con una importante concentración de nitrato, así como de fosfato.

El cilindro se rellenó de material soporte hasta alcanzar una altura total de 1.5 metros (0.1 m^3 de volumen efectivo). Este dato se desprende de los ensayos realizados por Gómez (1998) en los que se describía que las zonas altas de la columna no eran efectivas, pudiendo de este modo reducir la altura de relleno. El material con una granulometría que oscilaba entre 2 y 5 mm, fue seleccionado anteriormente en la fase de investigación de choque, por lo que se evitaban problemas en el sistema derivados del desgaste de dicho material.

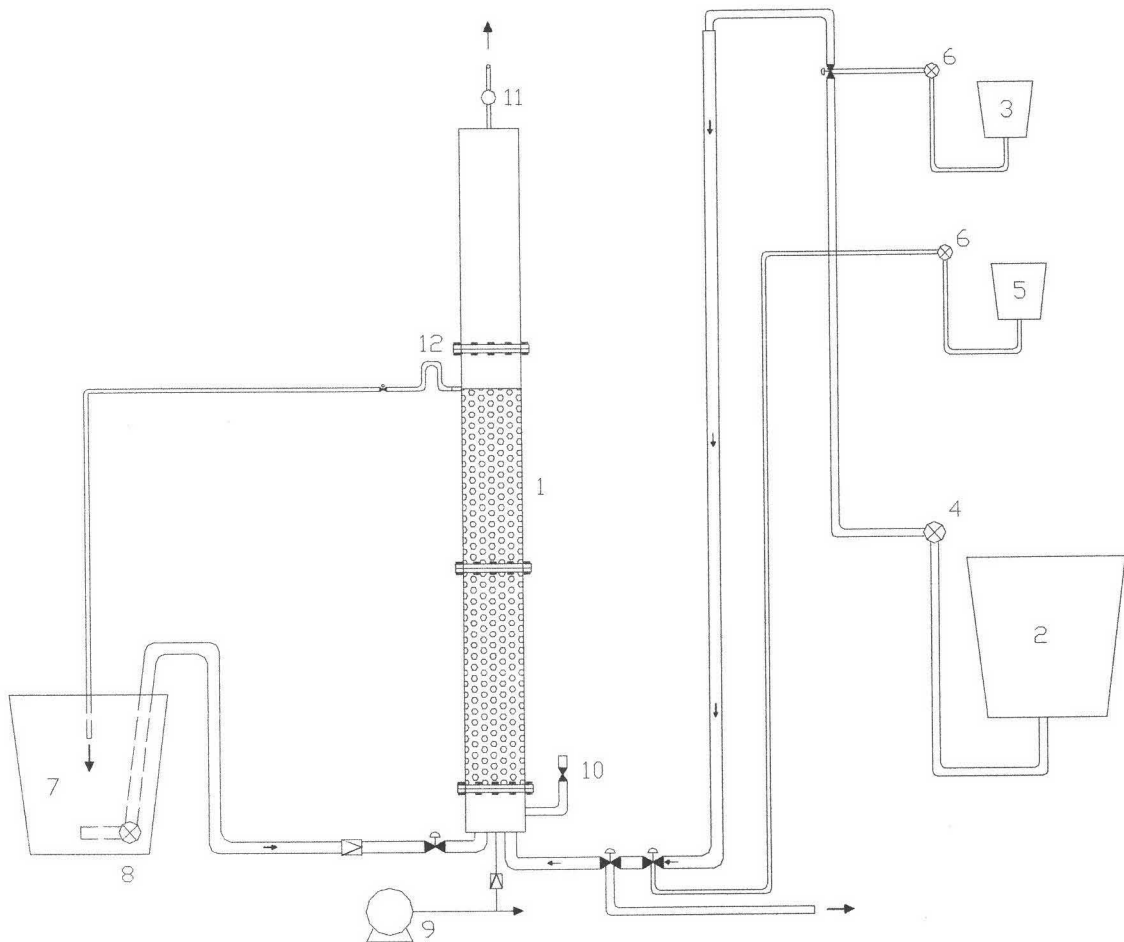


Fig. VI.2. Esquema del funcionamiento de la planta piloto a escala semitécnica.

1, Filtro sumergido; 2, Depósito de influente; 3, Depósito de nitrato y fosfato; 4, Bomba de entrada de agua; 5, Depósito de fuente de carbono; 6, Bombas dosificadoras; 7, Depósito de efluente; 8, Bomba de lavado; 9, Compresor de aire; 10, Válvula de seguridad; 11, Salida de aire; 12, Salida en forma de sifón.

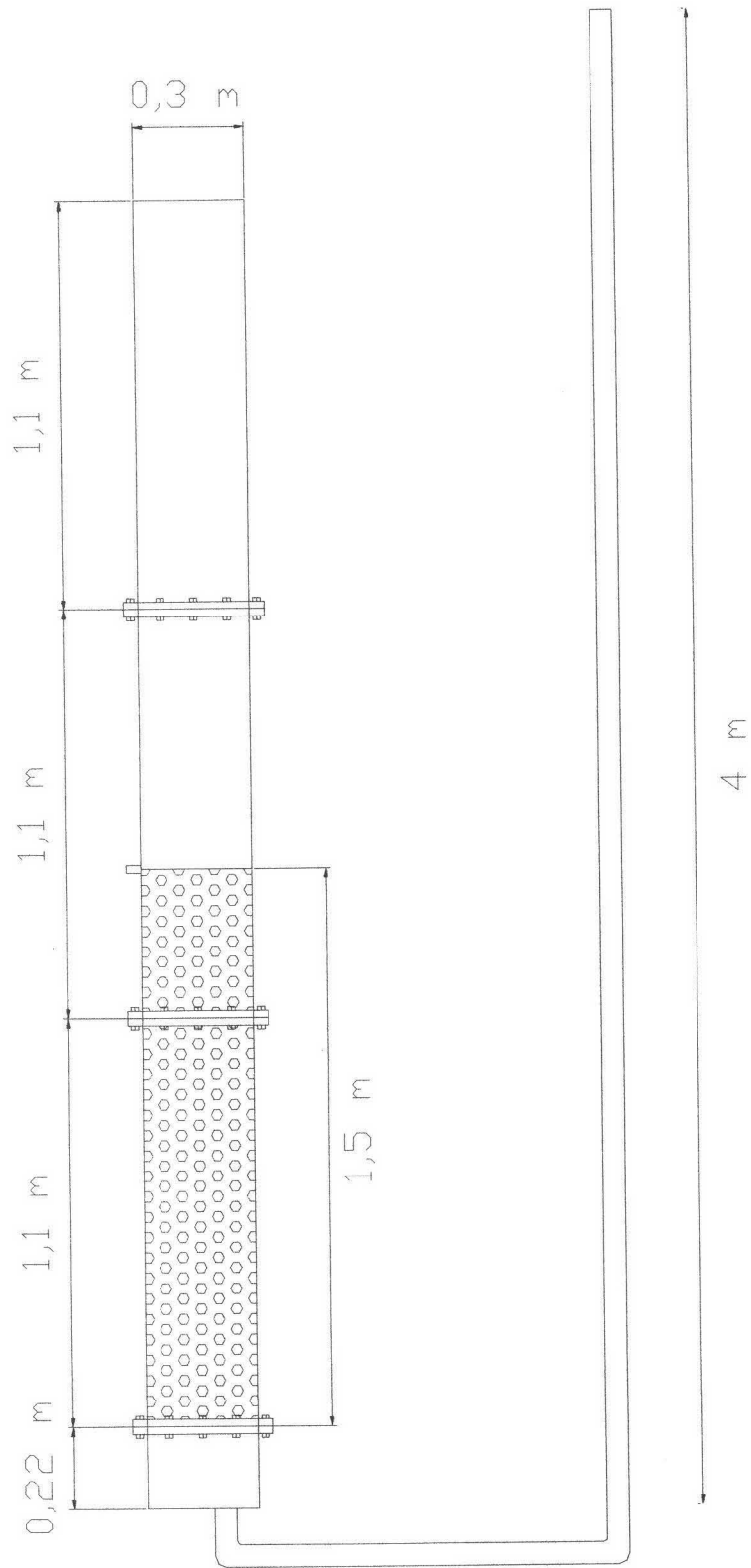


Fig. VI.3. Dimensiones de la planta a escala semitécnica.

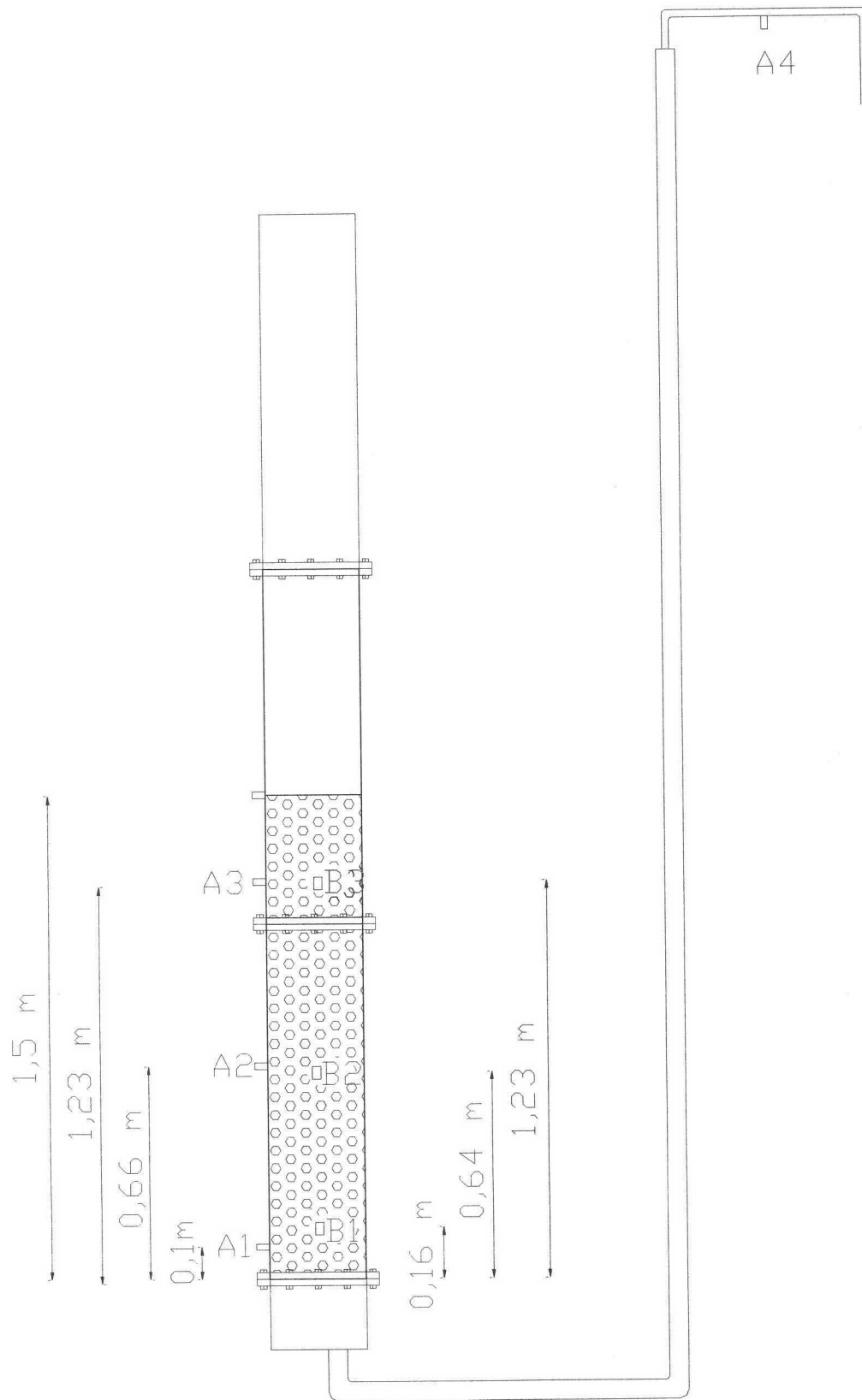


Fig. VI.4. Disposición de los muestreadores en la planta piloto.

En la planta se dispusieron tres muestreadores de material de relleno y otros tres para muestreo de agua colocados a diferentes alturas (Fig. VI.4).

Junto con el cilindro central la planta contaba con una serie de elementos, los cuales aparecen descritos en el esquema de la Figura VI.1. Entre estos componentes encontramos:

- Alimentación inferior del agua a tratar.
El agua necesaria se tomó mediante bombeo de un pozo del acuífero de la Vega de Granada, almacenándola en un depósito de 1,7 m³ de capacidad para poder manipularla previo a la entrada al sistema de tratamiento. Este depósito se recargaba automáticamente de agua desde el pozo al descender su nivel bajo 0.2 m³. Para introducir el agua en la planta se empleó una bomba dosificadora, tipo pistón (OBL/TFB[®]), capaz de proporcionar caudales regulables entre 0 y 100 l/h.
- Alimentación inferior de la fuente de carbono.
En el tubo de entrada a la planta se dosificó la fuente de carbono, empleando para ello una bomba dosificadora de membrana (Dosapro Milton Roy[®]) capaz de proporcionar caudales regulables entre 0 y 25 ml/min. La fuente de carbono empleada fue etanol, en relación C/N = 1.08, y se almacenó en un depósito de 30 litros conectado a la bomba dosificadora.
- Alimentación inferior de nitrato y fosfato.
El acuífero de la Vega del que procedía la entrada de agua a la planta, poseía una concentración de nitrato variable entre 50 y 70 mg/l. Así pues, para estudiar mayores concentraciones de nitrato en el agua de entrada, se colocó una bomba dosificadora de iguales características que la de etanol conectada a un depósito de 30 l de disolución de nitrato sódico de forma que se pudiese obtener diferentes concentraciones de nitrato en el influente. En este depósito se añadió también fosfato para obtener una concentración de fósforo en el influente de 0,06 mg/l.

- Salida del agua tratada.
La salida de agua se situó justo por encima del material de relleno, colocando un sifón para evitar la entrada de gases y para conseguir que el filtro funcionase inundado. Este agua se recogió en un depósito de salida empleándose como agua de lavado.
- Sistema de lavado manual.
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 a base 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 de $60 \text{ m}^3/\text{h}/\text{m}^2$. El aire de lavado se aportó mediante un compresor (ABAKOM[®] HP-2) de 50 l de capacidad y capaz de proporcionar una presión de $10 \text{ kg}/\text{cm}^2$. El caudal de aire de lavado se controló igualmente por un caudalímetro y se estableció en $50 \text{ m}^3/\text{h}/\text{m}^2$. Tanto el aire como el agua de lavado se introdujeron por la parte inferior de la planta a través del falso fondo. Los lavados se realizaron de forma manual tras observar pérdidas de carga en el sistema.
- Válvula de seguridad.
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 $2 \text{ kg}/\text{cm}^2$.

El sistema se inoculó con un cultivo bacteriano puro de alta densidad (*H. pseudoflava*) seleccionado en la fase anterior de la investigación, el cual una vez preparado se recirculó a través del filtro con la idea de formar la biopelícula bacteriana responsable del proceso de desnitrificación. Para esta fase de arranque del sistema, la columna se rellenó de agua de pozo adicionada de nutrientes (etanol, nitrato, fosfato...) en concentraciones semejantes a las del medio de cultivo empleado para el crecimiento de la bacteria. Una vez rellena de agua la columna, se adicionaron 20 litros de cultivo puro de alta densidad bacteriana manteniéndolo en recirculación durante 24 horas.

VI.2.- MODIFICACIÓN DE VARIABLES Y PARÁMETROS

Las variables y parámetros de la investigación de fondo variaron respecto de los de la investigación de choque, pues en aquel caso se buscaba conocer el tiempo de recirculación y el cultivo más idóneo para formación de la biopelícula para lo cual los parámetros que se controlaron fueron tanto sobre el agua (para conocer el rendimiento del sistema) como sobre el relleno (para estudiar la biopelícula formada en cada caso).

Una vez seleccionados el tiempo de recirculación y el cultivo para formación de la biopelícula, en la investigación de fondo se buscaba mejorar el diseño del filtro sumergido para desnitrificación de aguas subterráneas, considerando nuevas variables y parámetros.

Las **VARIABLES** que se controlaron en el proceso fueron:

- **Caudal de entrada de agua.** Se pretendía así conocer la carga hidráulica máxima para la cual el filtro tenía un rendimiento óptimo, estando el nitrato y nitrito del efluente dentro del límite permitido por la legislación.
- **Concentración de nitrato del influente.** Variando esta concentración se buscaba estudiar diferentes cargas superficiales y comprobar para cada una el rendimiento del proceso de desnitrificación.

Los **PARÁMETROS** que se controlaron en el proceso fueron únicamente sobre el agua tratada, ya que sobre el relleno se estudiaron detalladamente en las plantas a escala de laboratorio. Estos parámetros se analizaron diariamente y fueron los siguientes:

- a) Concentración de nitrato y nitrito para comprobar el rendimiento de la planta en eliminación de nitrógeno.
- b) Turbidez. Este parámetro nos daba idea del posible desprendimiento de la biopelícula del relleno y de la necesidad de tratamientos posteriores del agua

desnitrificada.

- c) DQO, para estimar el etanol en el agua de salida en función de la carga hidráulica y de la carga de nitrato.

VI.3.- PLAN DE TRABAJO

Para realizar el estudio de los parámetros de diseño se procedió en primer lugar a la formación de la biopelícula responsable del proceso de desnitrificación. Para ello se preparó un volumen de 20 l del inóculo con la cepa seleccionada en la investigación de choque (*H. pseudoflava*). El recuento de microorganismos en este inóculo fue de 1×10^{10} ufc/ml. Para poder mantener la planta en recirculación con el volumen preparado, se procedió en primer lugar al llenado de ésta con agua de pozo y alimentación con nutrientes. El recuento de microorganismos en el agua una vez mezclado el inóculo con el agua de pozo fue de 1×10^7 ufc/ml. De esta forma se mantuvo la planta en recirculación durante 24 horas.

Finalizado este tiempo de recirculación se puso la planta en marcha con un caudal de entrada de 710 l/d (carga hidráulica = $10 \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{d}$) y una concentración media de nitrato en el influente de 100 mg/l; se tomaron muestras diarias del agua de entrada a la planta y del agua de salida a la planta para proceder a su análisis. En estas condiciones se mantuvo la planta funcionando durante 12 días, procediendo posteriormente a incrementar el caudal de entrada manteniendo el mismo plan de trabajo. Así pues, se estudiaron nuevos incrementos de caudal durante el mismo período de funcionamiento de 12 días cada uno. Estos caudales fueron 884, 1066, 1411, 2117 y 2736 l/d (caudal máximo de funcionamiento de la bomba de entrada), obteniéndose las siguientes cargas hidráulicas: 12.5, 15.0, 20.0, 30.0 y $39.0 \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{d}$, respectivamente.

El caudal máximo de funcionamiento de la bomba era 2736 l/d, por lo que la máxima carga hidráulica que se pudo estudiar en esta planta semi-técnica fue de $39 \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{d}$. A partir de aquí, se procedió a incrementar el nitrato de entrada a la planta para

estudiar el funcionamiento del sistema para incrementos en la carga superficial. Las cargas superficiales estudiadas fueron 4.0, 5.5, 7.0 y 9.0 kg NO₃⁻/m²/d.

Para cada una de las cargas hidráulicas y superficiales se estudió el régimen de lavados necesario y la recuperación de la planta tras dicho lavado.

En todas las fases de la investigación, los datos se tomaron entre 15 y 20 °C, despreciándose los datos analizados fuera de ese rango de temperaturas.

VI.4.- RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN DE FONDO

La investigación de fondo se planteó de forma que se pudiesen conocer los valores máximos de carga hidráulica y carga superficial a los cuales se podría trabajar en condiciones óptimas (eliminación de nitrato y nitrito bajo las exigencias legislativas), con la idea de mejorar los ya obtenidos en investigaciones anteriores. La mejora sustancial del sistema se basaba en la aplicación de la inoculación selectiva, que como se indicó en la investigación de choque, ofrecía ventajas respecto a una formación de biopelícula con inoculante heterogéneo, en aspectos como el menor tiempo de recirculación necesario o los mejores rendimientos obtenidos en ensayos a escala de laboratorio.

Para la obtención de parámetros de diseño, se hace necesario ensayar el sistema a escala superior (semi-técnica), donde el comportamiento del microorganismo empleado en la inoculación selectiva, puede variar del ofrecido a escala de laboratorio. Estos ensayos dan a conocer el comportamiento del sistema, permitiendo compararlos con los ensayos previos donde se utilizaba licor mezcla en las inoculaciones.

VI.4.1. Influencia de la carga hidráulica.

Como se indicó anteriormente, tras la inoculación del biofiltro a escala semi-técnica, se comenzó a pasar el influente contaminado con nitrato y valores de oxígeno que no superaron en ningún caso los 4 mg/l, concentraciones para las cuales el efecto del oxígeno era poco significativo (Gómez *et al.*, 2000).

El primer valor de carga hidráulica ensayado fue de $10 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$. Para estas condiciones de trabajo la concentración de nitrato en el efluente tratado estaban bajo los 20 mg/l, valores muy inferiores a los permitidos por la legislación vigente, sin embargo un incremento en la carga de nitrato (aumento de los valores de la concentración de nitrato de entrada desde 80 a 105 mg/l) dio lugar a una pérdida significativa en el rendimiento superándose la barrera de los 50 mg/l (Figura VI.5). Dicha pérdida no manifestaba una mala adaptación del sistema al incremento en la carga superficial (aspectos que se tratarán más adelante), sino que la concentración de etanol no fue

suficiente (caída de la relación C/N de 1.08 a 0.75) ya que el bombeo de fuente de carbono permaneció inalterado.

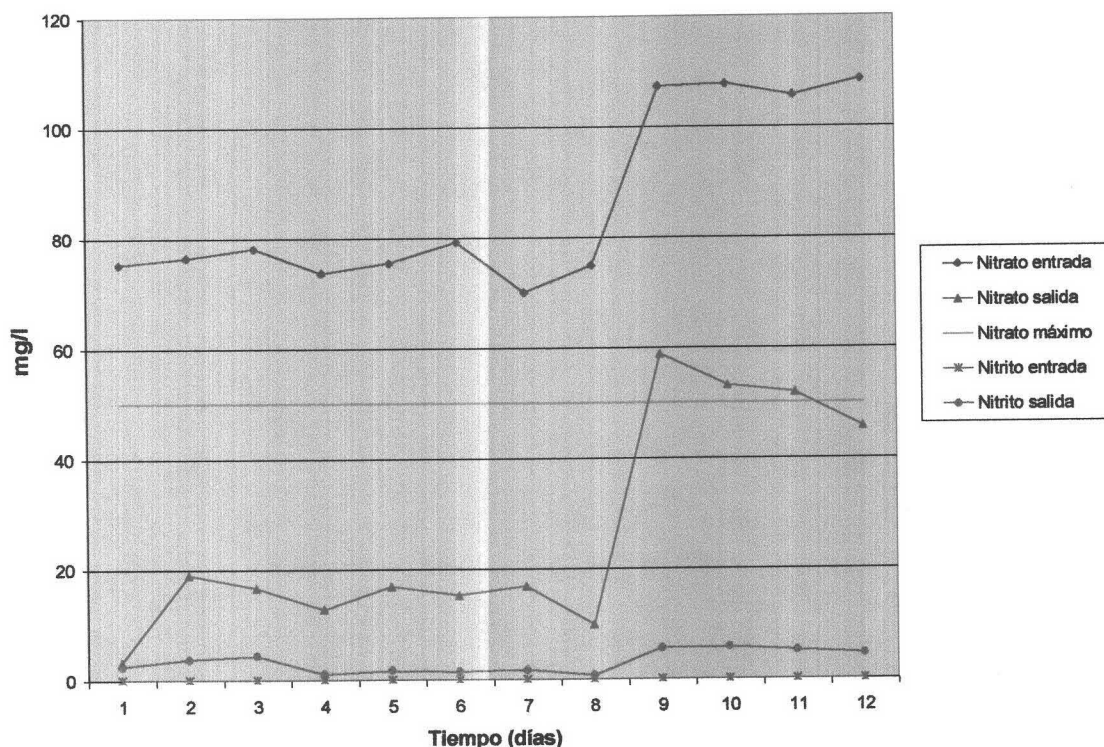


Fig. VI.5. Concentración de nitrato y nitrito para $Ch = 10 \text{ m}^3/(\text{m}^2\cdot\text{d})$

Las concentraciones de nitrito en el agua tratada eran superiores a las marcadas por la legislación (0.1 mg/l) sin embargo los valores obtenidos se mantenían en todo momento bajo los 3 mg/l. Para este anión también se observó un leve incremento en su concentración tras el aumento de la concentración de nitrato en el influente.

Debido al arrastre sufrido por la biopelícula a consecuencia del flujo de agua a través del biofiltro, la turbidez del agua experimentó un incremento, pasando de valores cercanos a 2 UNT para el agua procedente del pozo a valores medios de 4 UNT. Este incremento no afectó a la potabilidad del agua, aunque sí empeoró una de sus características (figura VI.6). Este incremento en la presencia de biomasa procedente de la biopelícula, dio lugar a un incremento de los valores finales de D.Q.O. (Demanda Química de Oxígeno), lo cual dificultó la relación de este parámetro con la presencia de

etanol en el agua tratada. Un análisis de la concentración de este compuesto en el efluente tratado dio valores medios prácticamente despreciables (0.01 mg/l).

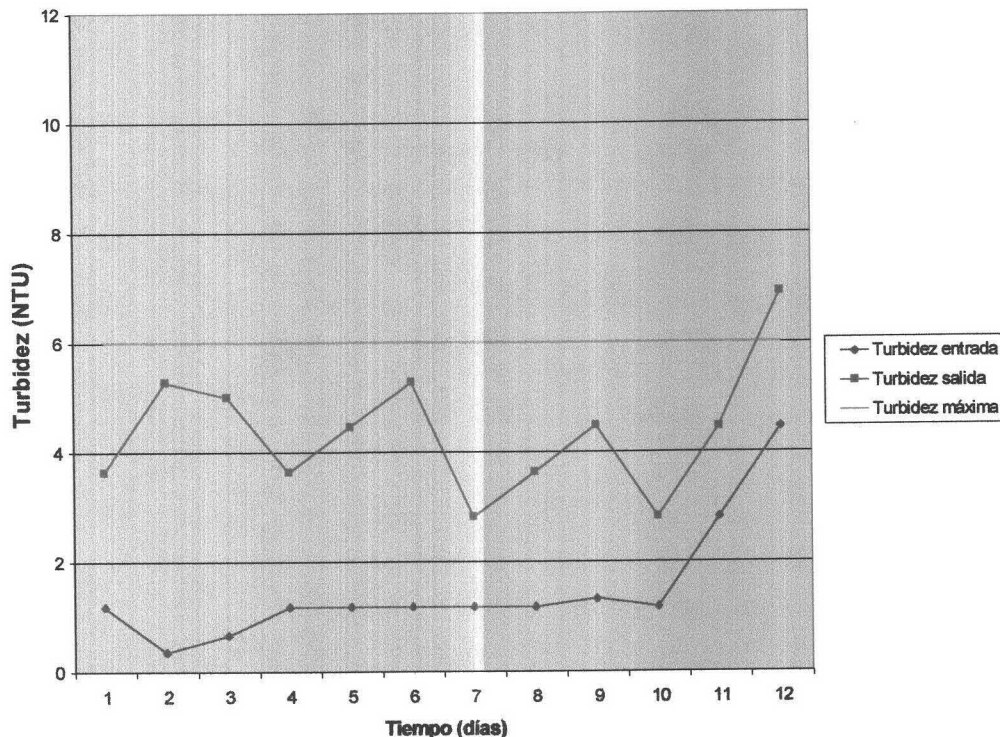


Fig. VI.6. Turbidez para $Ch = 10 \text{ m}^3/(\text{m}^2\cdot\text{d})$

Un incremento en la carga hidráulica de 2.5 puntos ($12.5 \text{ m}^3/(\text{m}^2\cdot\text{d})$) mostró unos rendimientos semejantes, estando los valores de nitrato de salida próximos a los 20 mg/l. En este ensayo se volvieron a apreciar variaciones en la carga de nitrato del influente, los cuales se compensaron en cuanto a la relación C/N mediante un control más riguroso de las concentraciones tras las dosificaciones de nutrientes realizados tras el 3^{er} día de funcionamiento. (Figura VI.7). Este mejor control de la dosificación se vio reflejado en la presencia de nitrito en el agua tratada, el cual mostró un incremento importante en los primeros días de funcionamiento, pasando a valores despreciables en el resto de días.

La turbidez en el agua de salida para la carga hidráulica de $12,5 \text{ m}^3/(\text{m}^2\cdot\text{d})$ (Fig.VI.8.), fue algo mayor que para la carga de $10 \text{ m}^3/(\text{m}^2\cdot\text{d})$, aunque la media continúa estando por debajo del límite máximo permitido por la legislación.

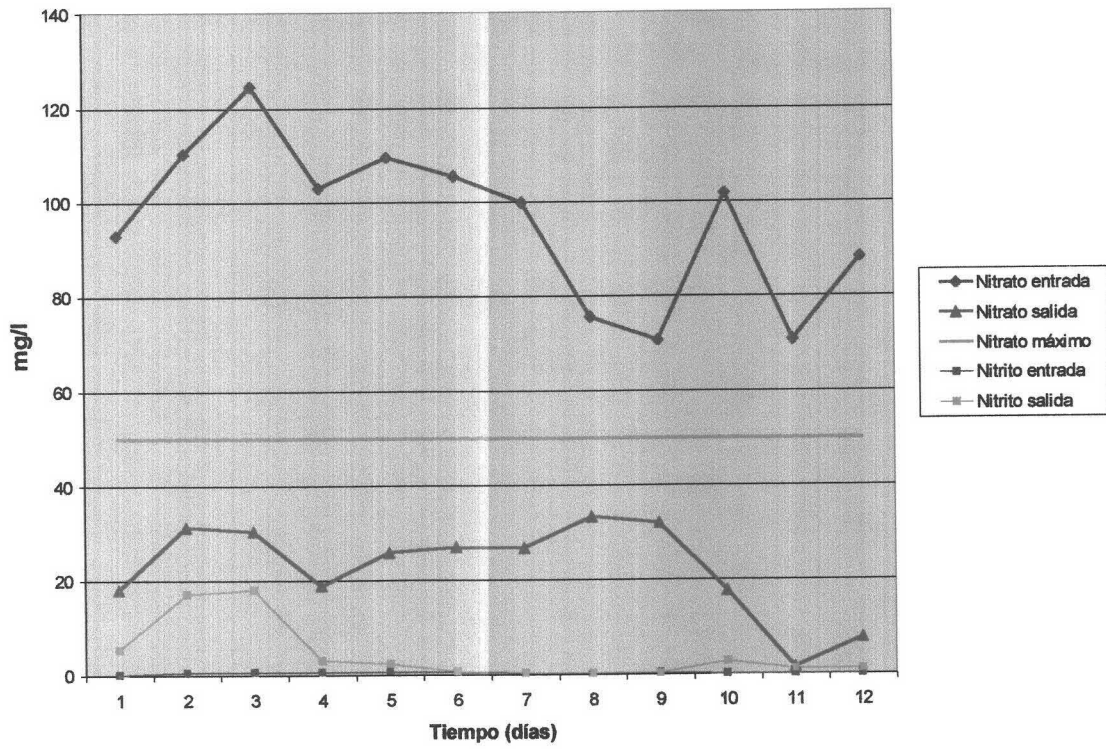


Fig. VI.7. Concentración de nitrato y nitrito para Ch = 12,5 m3/(m2-d)

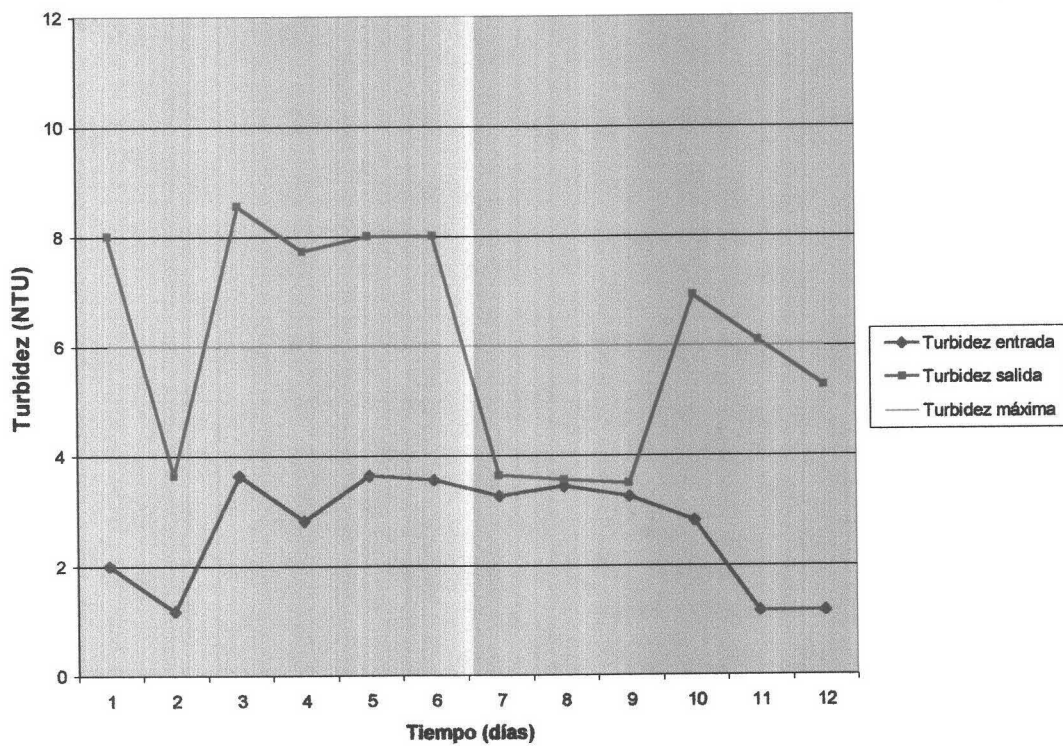


Fig. VI.8. Turbidez para Ch = 12,5 m3/(m2-d)

Para valores de caudal mayores, alcanzando una carga hidráulica de $15 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$, el comportamiento del sistema fue semejante a los dos ensayos anteriores, aunque los valores medios de nitrato en la salida eran superiores, llegando a los 30 mg/l . Esta pérdida de rendimiento (5 puntos con respecto a la carga inmediatamente inferior ensayada) se dio nuevamente por problemas en la dosificación de fuente de carbono, lo cual motivó que puntualmente se alcanzaran valores que superaban la barrera de los 50 mg/l de nitrato. Este problema se manifestó también en la concentración de nitrito en el agua, para el cual se llegaron a apreciar valores superiores a 20 mg/l (Figura VI.9).

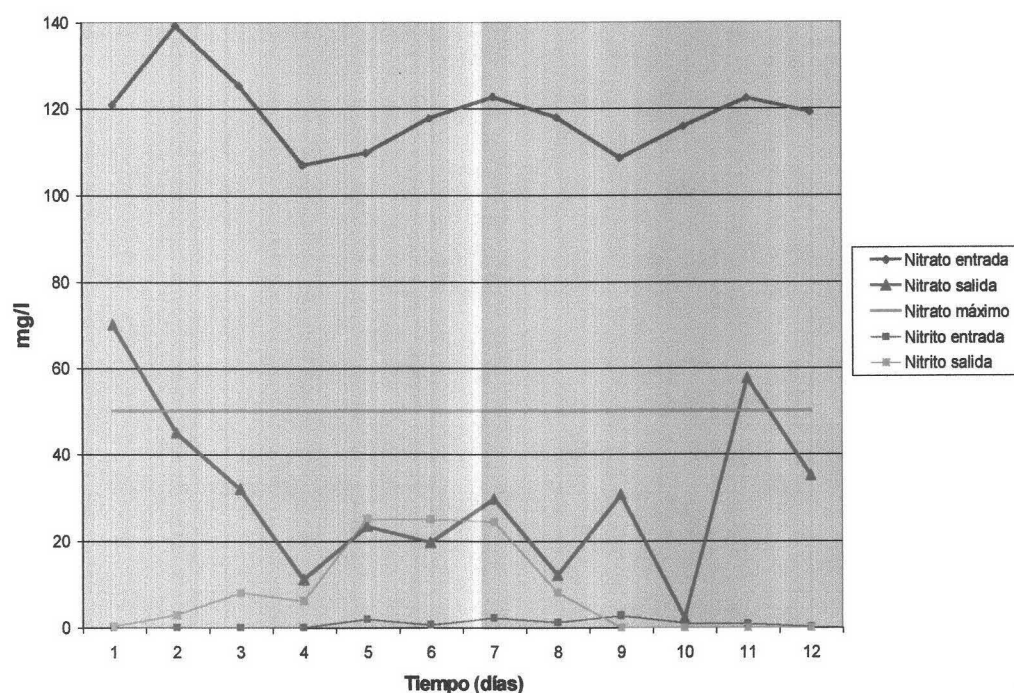


Fig. VI.9. Concentración de nitrato y nitrito para $Ch = 15 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$

Como era de esperar la turbidez en el agua de salida para una carga hidráulica de $15 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{día})$ sufrió un incremento respecto a los valores anteriores debido a los mayores desprendimientos de la biopelícula causados por el arrastre realizado por el flujo de agua, estando la media un poco por encima del valor máximo permitido por la legislación.

Tras este ensayo se incrementó la carga hidráulica en 5 puntos, alcanzando un valor de $20 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{día})$. Para este ensayo los valores de nitrato en el influente se mantuvieron cercanos a un valor de 110 mg/l , sin embargo nuevamente se detectaron fallos en la dosificación de etanol, lo cual afectó a los rendimientos.

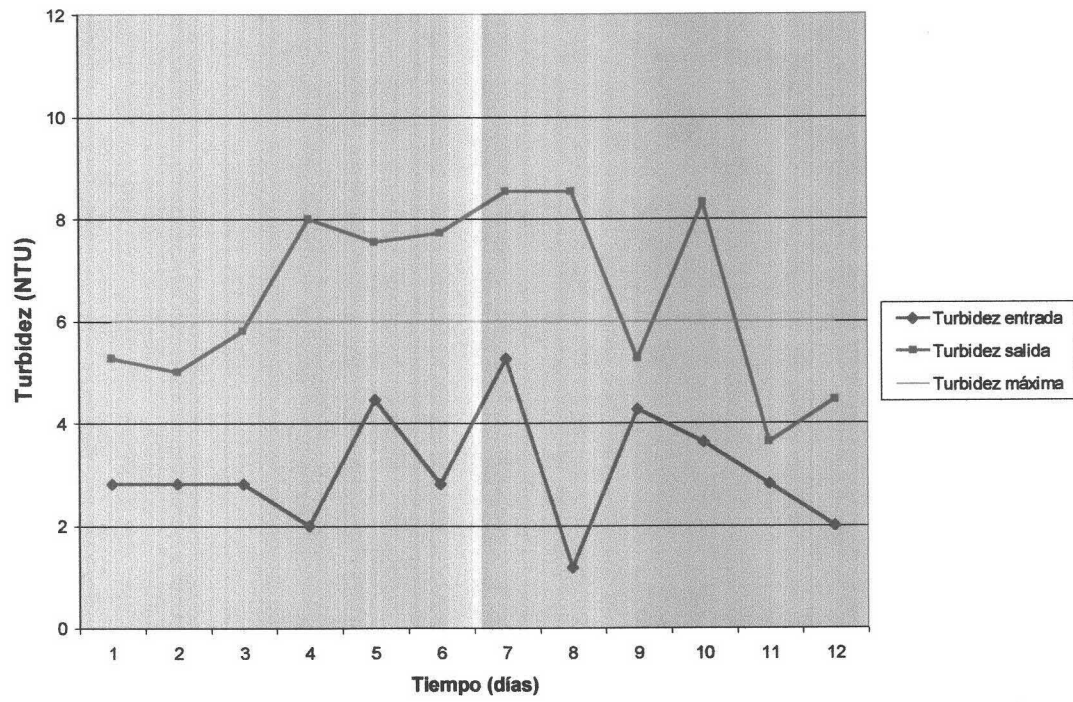


Fig. VI.10. Turbidez para $Ch = 15 \text{ m}^3/(\text{m}^2\cdot\text{d})$

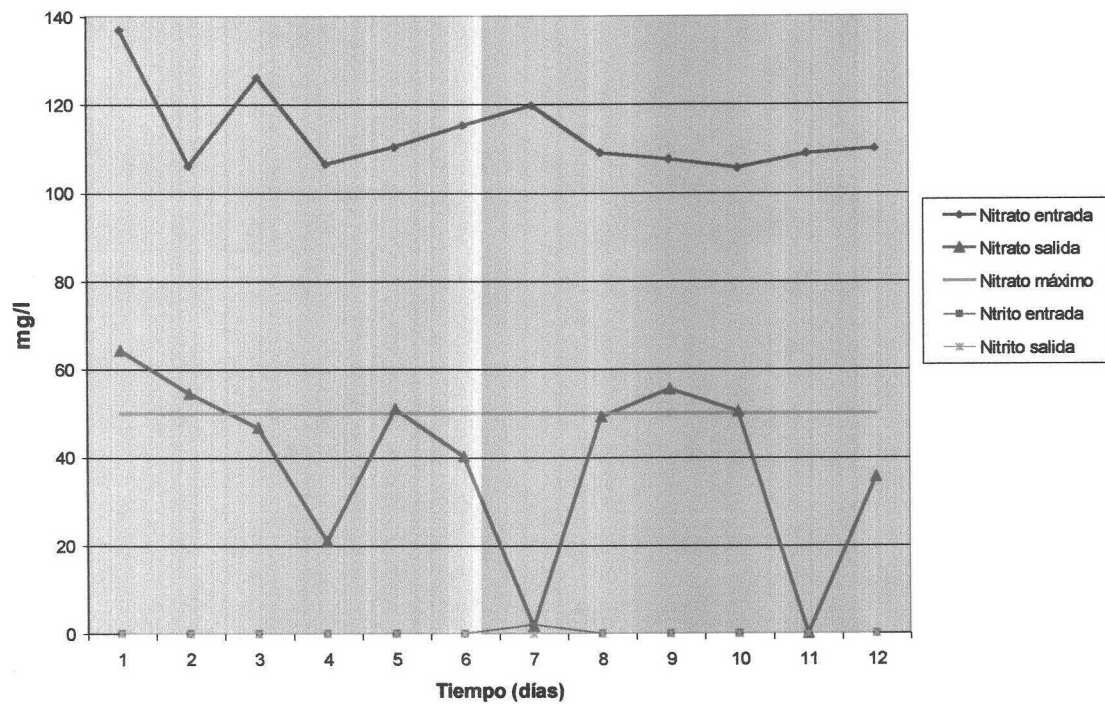


Fig. VI.11. Concentración de nitrato y nitrito para $Ch = 20 \text{ m}^3/(\text{m}^2\cdot\text{d})$

Tal y como puede apreciarse en la figura VI.11. los valores de nitrato en el agua de salida fueron muy irregulares, siendo el valor medio de esta concentración durante los doce días de funcionamiento de 39 mg/l, superior a los detectados anteriormente para cargas inferiores. Esto ponía de manifiesto un descenso en el rendimiento medio del sistema conforme se incrementaba la carga hidráulica. Los valores de nitrito en el efluente fueron inapreciables, a pesar de la mala dosificación de la fuente de carbono.

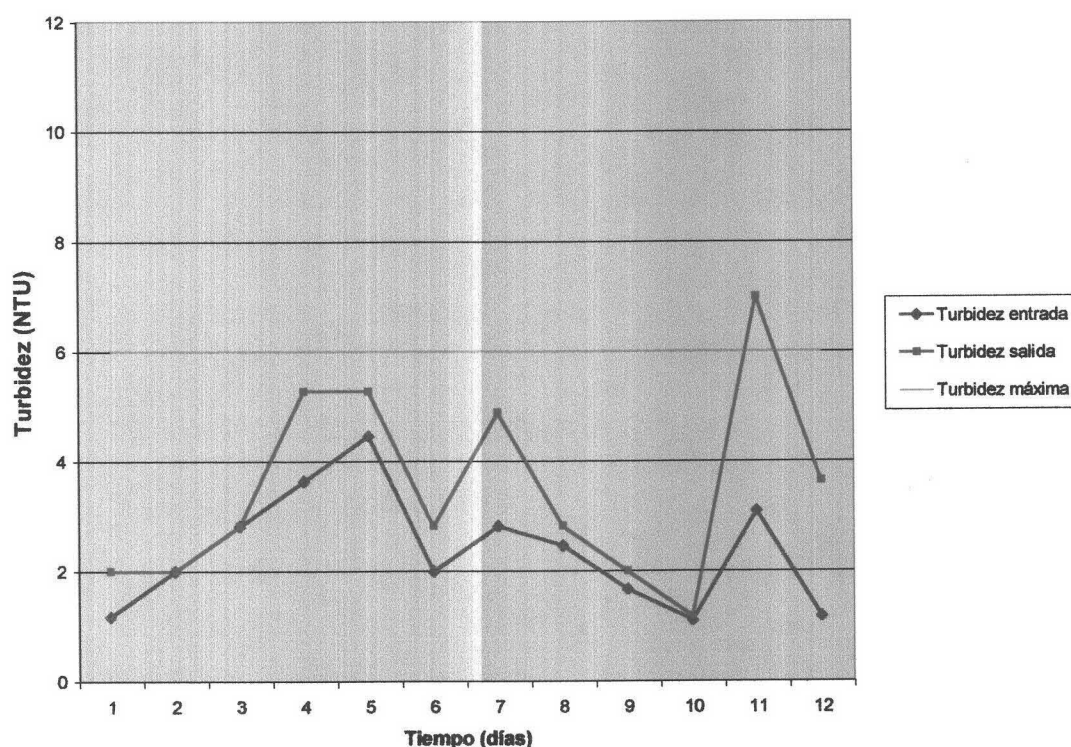


Fig. VI.12. Turbidez para $Ch = 20 \text{ m}^3/(\text{m}^2\cdot\text{d})$

En contra de lo que cabría esperar, en función del comportamiento del sistema manifestado en los ensayos anteriores, la turbidez en el agua de salida para la carga hidráulica de $20 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \text{ día})$ presentó valores inferiores a los apreciados con menores caudales, permaneciendo estos por debajo del límite permitido por la legislación prácticamente durante todo el período de funcionamiento (Figura VI.12.). Estos valores aunque superiores, no diferían mucho de los analizados para el influente, lo cual ponía de manifiesto un menor desprendimiento de la biopelícula a pesar de que el caudal de trabajo era mayor. Este efecto observado a consecuencia del incremento de la cantidad total de nutrientes que se introducían en el filtro, ponía de manifiesto una estabilidad superior de la biopelícula a la presentada en los ensayos anteriores.

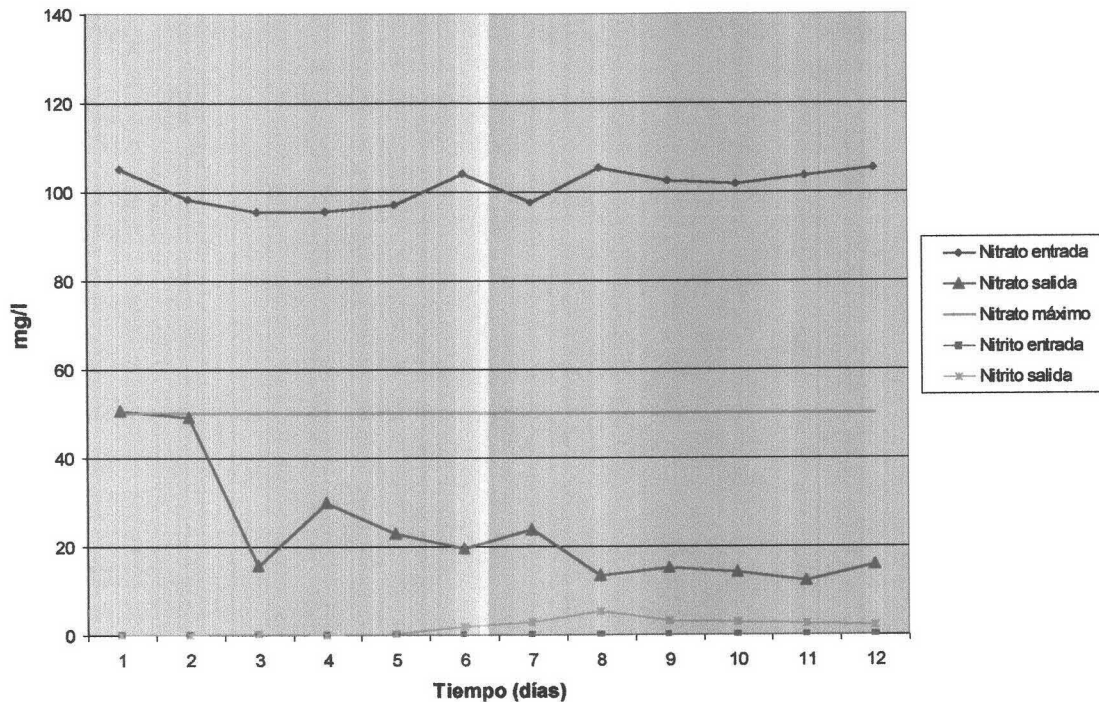


Fig. VI.13. Concentración de nitrato y nitrito para $Ch = 30 \text{ m}^3/(\text{m}^2\cdot\text{d})$

Tras apreciar la estabilidad de la biopelícula con la carga hidráulica de $20 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \text{ día})$, ésta se incrementó hasta alcanzar valores de $30 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \text{ día})$. Para este ensayo, las concentraciones de nitrato en el agua de salida (Fig. VI.13.) volvieron a presentar valores alrededor de 20 mg/l , con un rendimiento próximo al 80%. En este caso se consiguió mantener constante la concentración de nitrato en el influente, a la vez que no se presentaban fluctuaciones en la relación C/N debido al cambio de la bomba dosificadora de etanol.

Los valores medios de las concentraciones de nitrito en el efluente fueron de $1,8 \text{ mg/l}$, no apreciándose incrementos por acumulación en la concentración de este anión. La concentración media de nitrógeno total en el agua tratada fue de $5,9 \text{ mg/l}$, valor muy inferior al máximo permitido por la legislación (11 mg N/l).

La turbidez en el agua de salida para la carga hidráulica de $30 \text{ m}^3/(\text{m}^2\cdot\text{d})$ (Fig. VI.14.) se mantuvo prácticamente durante todo el período de funcionamiento por debajo de 6 NTU , límite máximo permitido por la legislación para considerar potable el agua. Sus valores medios fueron muy semejantes a los observados para los ensayos con la carga hidráulica inmediatamente inferior, aunque ligeramente superiores.

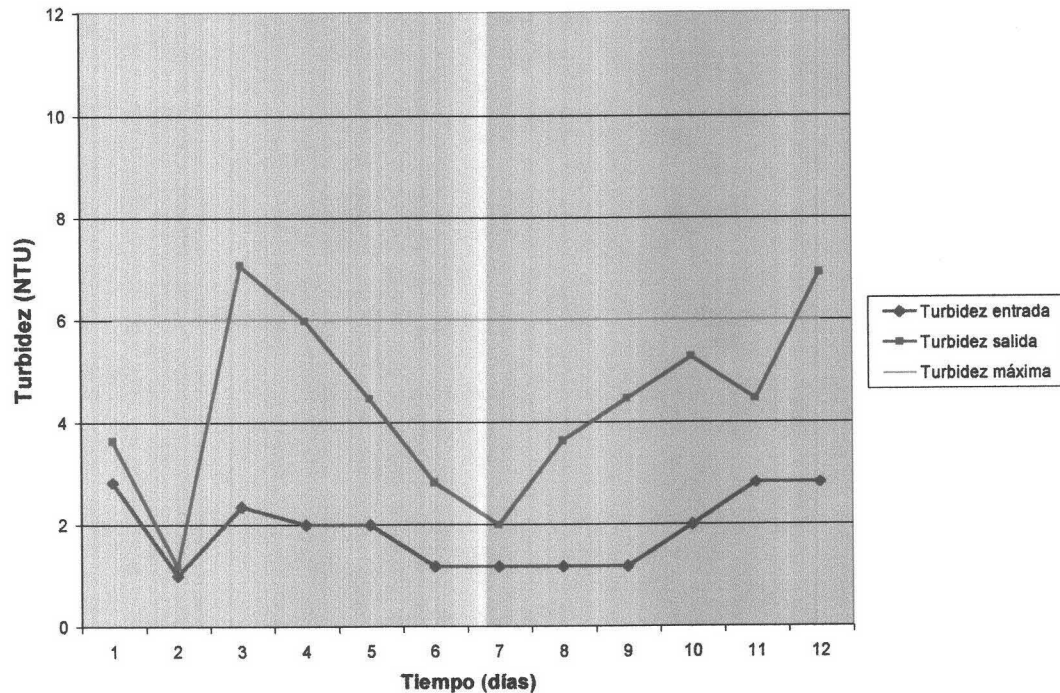


Fig. VI.14. Turbidez para $Ch = 30 \text{ m}^3/(\text{m}^2\cdot\text{d})$

El valor máximo de carga hidráulica ensayado fue el de $39 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \text{ día})$, debido a las limitaciones de la bomba de influente. En este caso nuevamente se detectó un rendimiento en torno al 80%, estando los valores finales de nitrato para el efluente tratado en torno a 20 mg/l (Figura VI. 15.).

Para este ensayo sí se comenzaba a apreciar un efecto de la carga hidráulica frente a la presencia de nitrito en el agua tratada con valores medios que oscilaban en torno a los 10 mg/l , los más altos presentados en todos los ensayos (Figura VI.15.). Esto empeoraba las características del agua tratada, sin embargo, la facilidad con la que esta sustancia es oxidada a nitrato, garantizaba su fácil eliminación del agua. En este caso se le debe dar importancia al rendimiento en eliminación de nitrógeno total, que oscilaba en torno al 70%.

Los valores de turbidez en el agua de salida (Fig. VI.16.) fueron muy similares a los obtenidos en los ensayos anteriores, estando normalmente siempre por debajo de 6 UNT. Esto seguía poniendo de manifiesto la mayor estabilidad alcanzada por la biopelícula para valores altos de carga hidráulica.

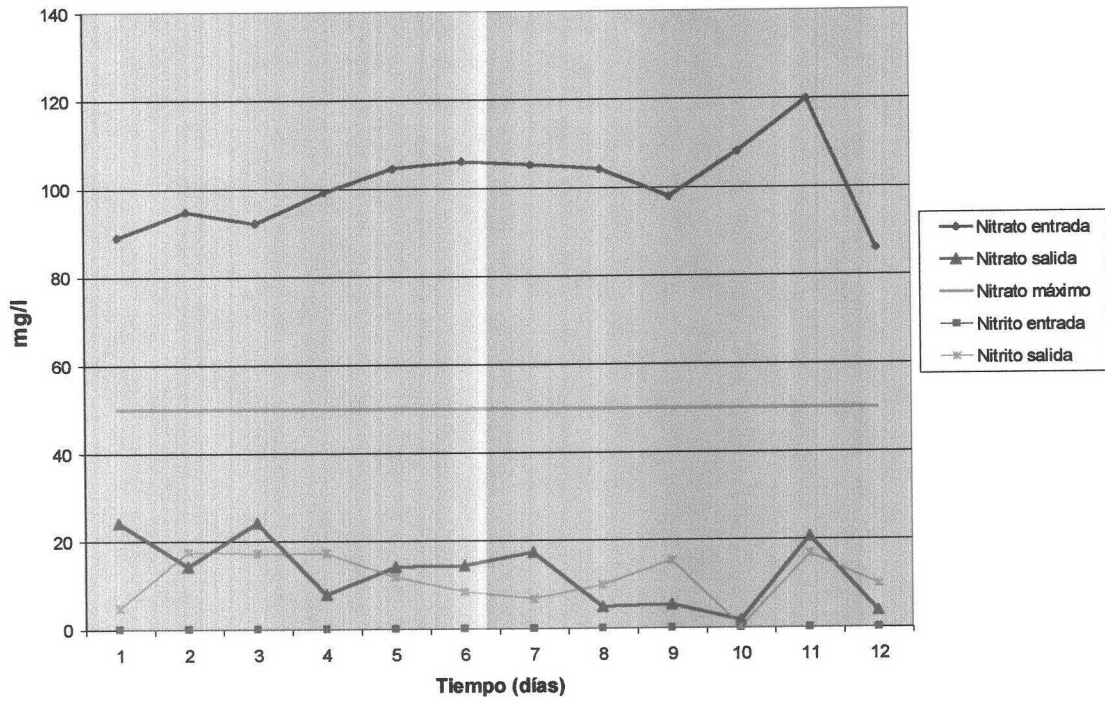


Fig. VI.15. Concentración de nitrato y nitrito para Ch = 39 m3/(m2-d)

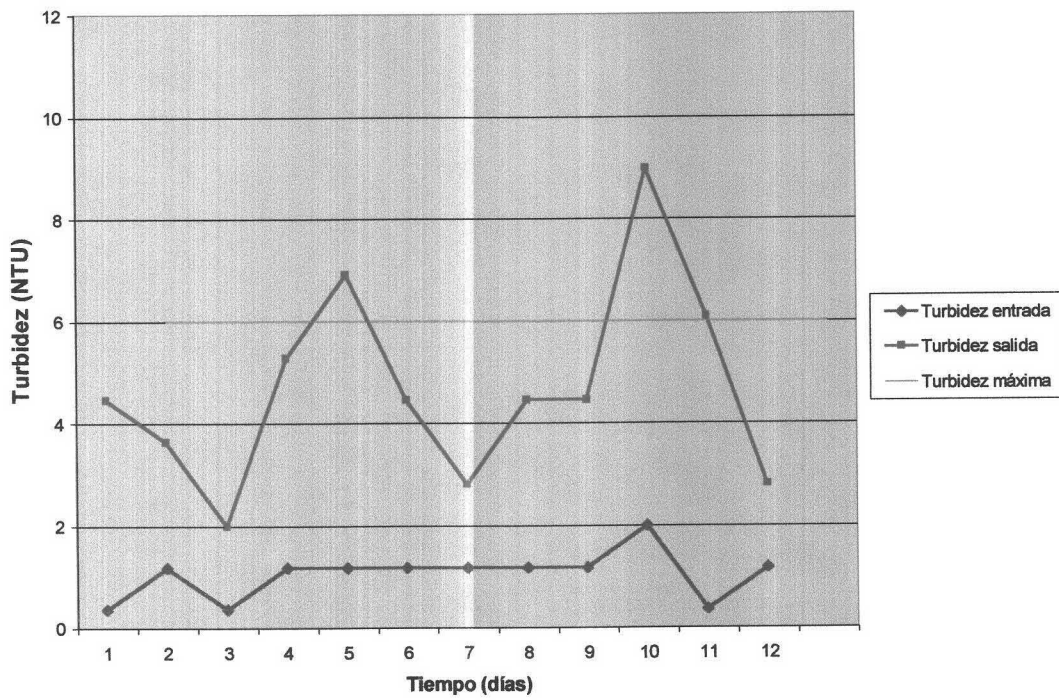


Fig. VI.16. Turbidez para Ch = 39 m3/(m2-d)

Con la idea de conocer el comportamiento global del sistema, en cuanto a las concentraciones de nitrato y nitrito en el agua tratada, se intentó ajustar los valores obtenidos a algún tipo de ecuación, observándose un ajuste polinómico de tipo convexo ($r^2 = 0.7671$) para el comportamiento del nitrato y polinómico de tipo cóncavo para el nitrito ($r^2 = 0.5264$). Como puede observarse en la figura VI.17. las concentraciones de nitrato en el influente experimentan un aumento en su valor conforme se incrementa la carga hidráulica, comenzando a descender para cargas superiores a $21 \text{ m}^3(\text{m}^2 \text{ día})$. Este mismo comportamiento, pero de forma invertida fue observado para el nitrito con el punto de inflexión en $22 \text{ m}^3(\text{m}^2 \text{ día})$.

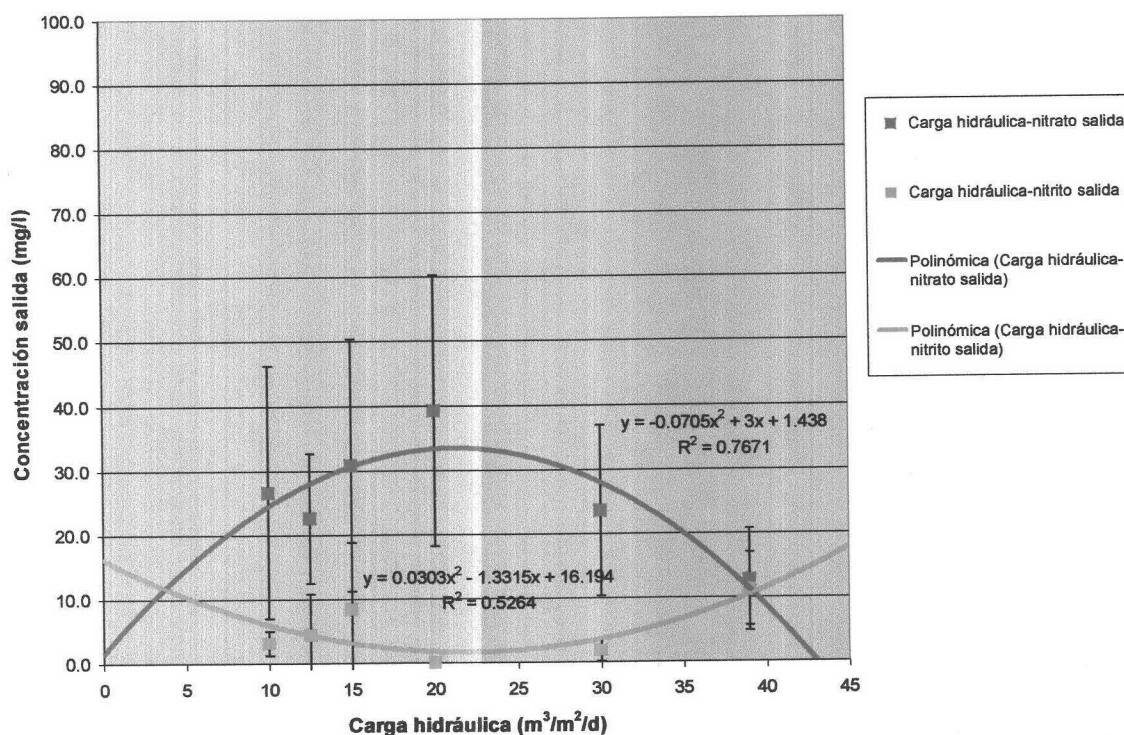


Fig. VI.17. Relación entre la carga hidráulica y las concentraciones de nitrato y nitrito en el efluente para una entrada media de nitrato de 100 mg/l .

(Las barras representan la media \pm la desviación estándar)

Para la máxima carga hidráulica ensayada, $39 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$, el valor medio de las concentraciones de nitrato y nitrito en el agua de salida fueron $12,7 \text{ mg/l}$ y $11,3 \text{ mg/l}$, respectivamente; por tanto, la concentración media de nitrógeno total fue de $6,31 \text{ mg/l}$, valor inferior al máximo permitido por la legislación (11 mg N/l).

Representando la relación entre la carga hidráulica y la turbidez de salida en el agua (Fig.VI.18.), se puede observar como este parámetro se mantenía en valores entre 4 y 6 UNT. El comportamiento de la turbidez fue análogo al de la capacidad de eliminación de nitrato por parte del sistema, sufriendo un incremento, aunque leve, conforme se incrementaba la carga hidráulica, para posteriormente descender a valores dentro de los límites de la legislación. Estos datos no se ajustaron a un comportamiento polinomial, pero ponían de manifiesto un importante cambio en la estabilidad de la biopelícula.

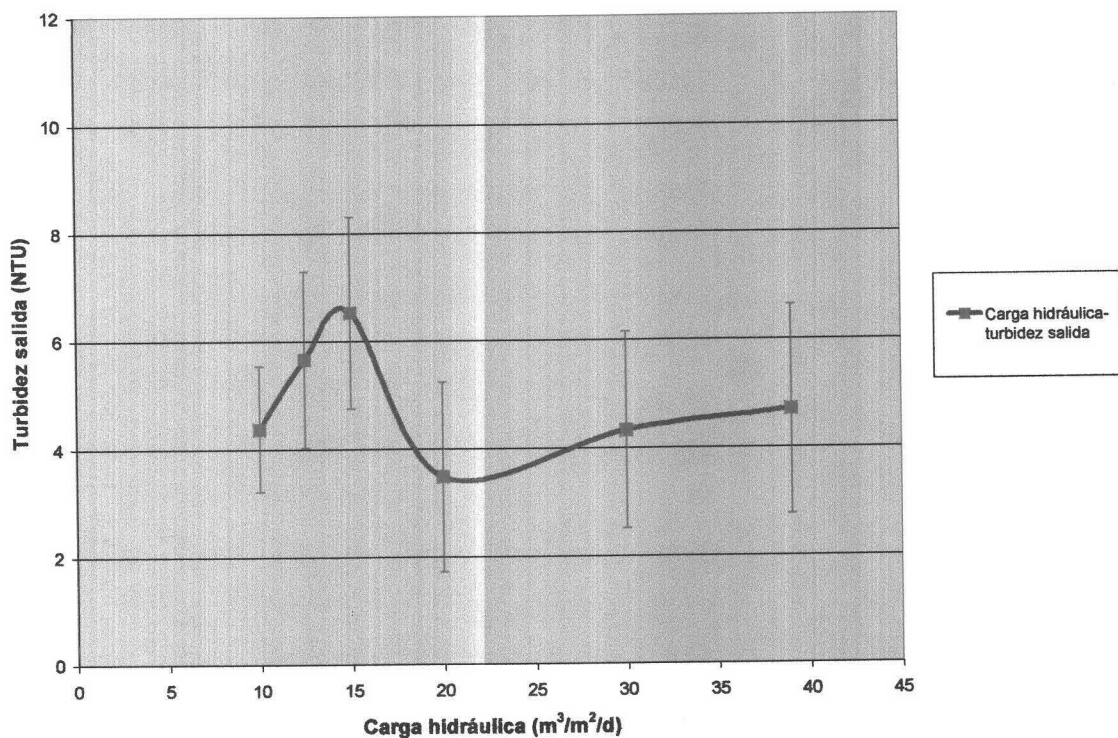


Fig. VI.18. Relación entre la carga hidráulica y la turbidez del efluente para una entrada media de nitrato de 100 mg/l.

(Las barras representan la media \pm la desviación estándar)

Los incrementos en la carga hidráulica sufrieron igualmente un aumento en la carga superficial diaria, motivado por la mayor cantidad de nitrato tratada conforme aumentaba el caudal de trabajo.

VI.4.2. Influencia de la carga superficial.

Una vez conocido el comportamiento del biofiltro en función de la carga hidráulica, se procedió a estudiar la influencia de la carga superficial de nitrato manteniendo constante el caudal de trabajo en $2.73 \text{ m}^3/\text{día}$, para el cual se obtenía el máximo valor de carga hidráulica ensayado. Los incrementos en las cargas se lograron por aumento de la concentración de nitrato en el influente.

La primera carga superficial ensayada fue de $4 \text{ kg NO}_3^-/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ manteniendo una carga hidráulica de $39 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$. En esta condiciones de trabajo la concentración media de nitrato en el agua tratada fue de $7,3 \text{ mg/l}$ (Figura VI. 19), valor inferior al observado en el último ensayo de carga hidráulica, donde la carga superficial fue de $3.6 \text{ kg NO}_3^-/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$. Este incremento en el rendimiento fue más acusado para las concentraciones de nitrito, las cuales pasaron de valores medios de 11.3 mg/l a $3,1 \text{ mg/l}$, valor que seguía siendo superior al permitido para un agua potable ($0,1 \text{ mg/l}$), pero más fácilmente oxidable a nitrato por su menor concentración.

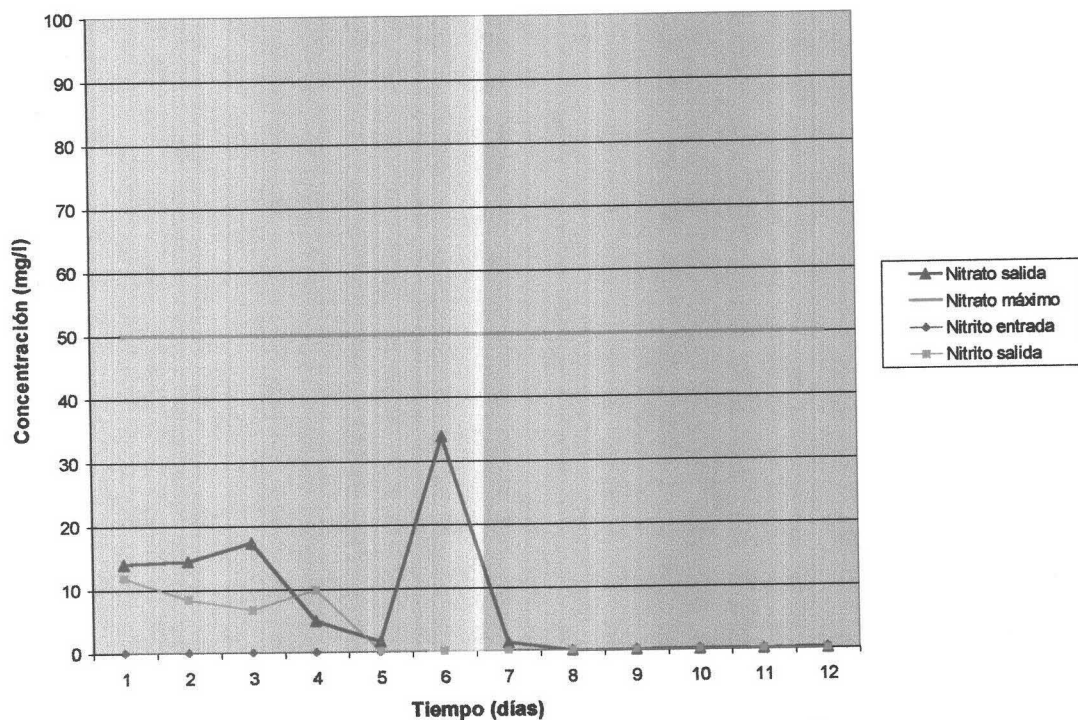


Fig. VI.19. Concentración de nitrato y nitrito para $Ch = 39 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ y $Cs = 4 \text{ KgNO}_3^-/\text{m}^2/\text{d}$ (Valor medio nitrato entrada= 103 mg/l)

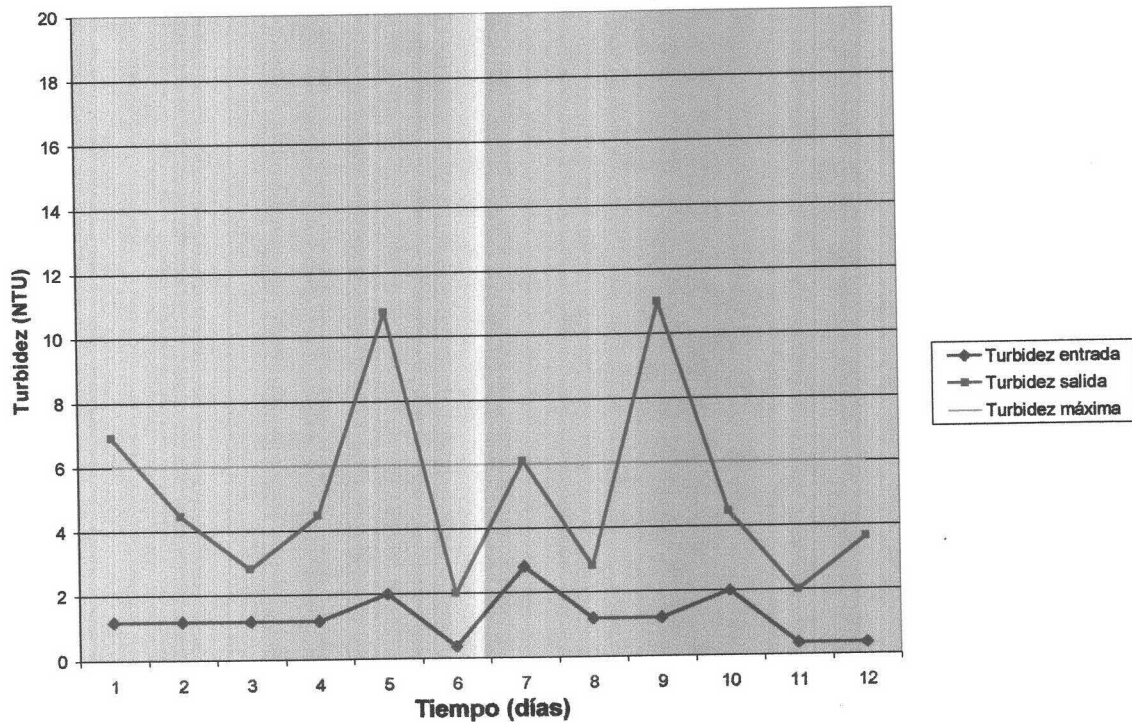


Fig. VI.20. Turbidez para $Ch = 39 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ y $Cs = 4 \text{ KgNO}_3^-/\text{m}^2/\text{d}$
(Valor medio nitrato entrada=103 mg/l)

La turbidez media en el efluente (Fig. VI.20.) presentó valores por debajo de 6 NTU, excepto en ocasiones puntuales en las que el valor se elevó por encima de 10 NTU probablemente debido a desprendimientos de la biopelícula. Estos valores medios de turbidez, fueron semejantes a los obtenidos trabajando con carga hidráulica de $39 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ y $3.5 \text{ kg NO}_3^-/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ de carga superficial.

Mediante incrementos en la concentración de nitrato en el influente, se alcanzó una carga superficial de $5,5 \text{ kg NO}_3^-/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$, manteniendo en todo momento el caudal de trabajo. Para estas condiciones las concentraciones de nitrato y nitrito en el efluente (Fig. VI.21.) aumentaron levemente con respecto a las obtenidas para una carga superficial de $4 \text{ kg NO}_3^-/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$, siendo los valores medios de $9,4 \text{ mg/l}$ de nitrato y de $4,9 \text{ mg/l}$ de nitrito.

La turbidez en el agua de salida experimentó un incremento en el valor medio final, siendo este aumento más importante que en el caso de las concentraciones de nitrógeno (Fig. VI.22.). Los valores se encontraban generalmente por encima de 6 NTU.

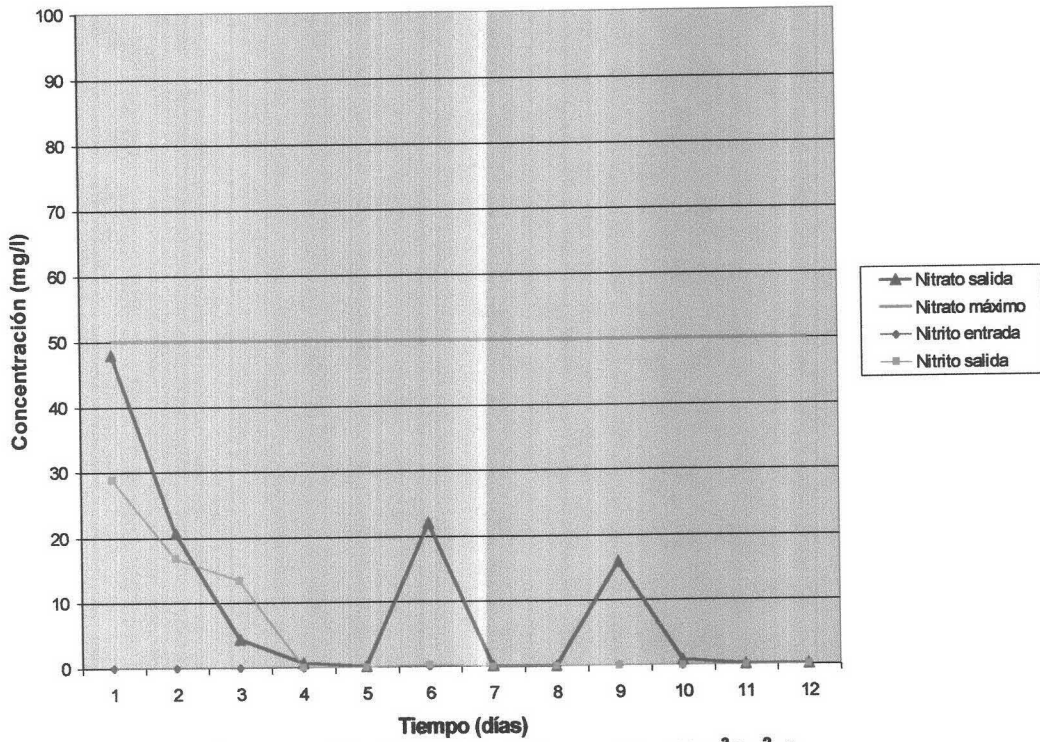


Fig. VI.21. Concentración de nitrato y nitrito para $Ch = 39 \text{ m}^3/(\text{m}^2\cdot\text{d})$ y $Cs = 5,5 \text{ KgNO}_3/\text{m}^2/\text{d}$ (Valor medio nitrato entrada=142 mg/l)

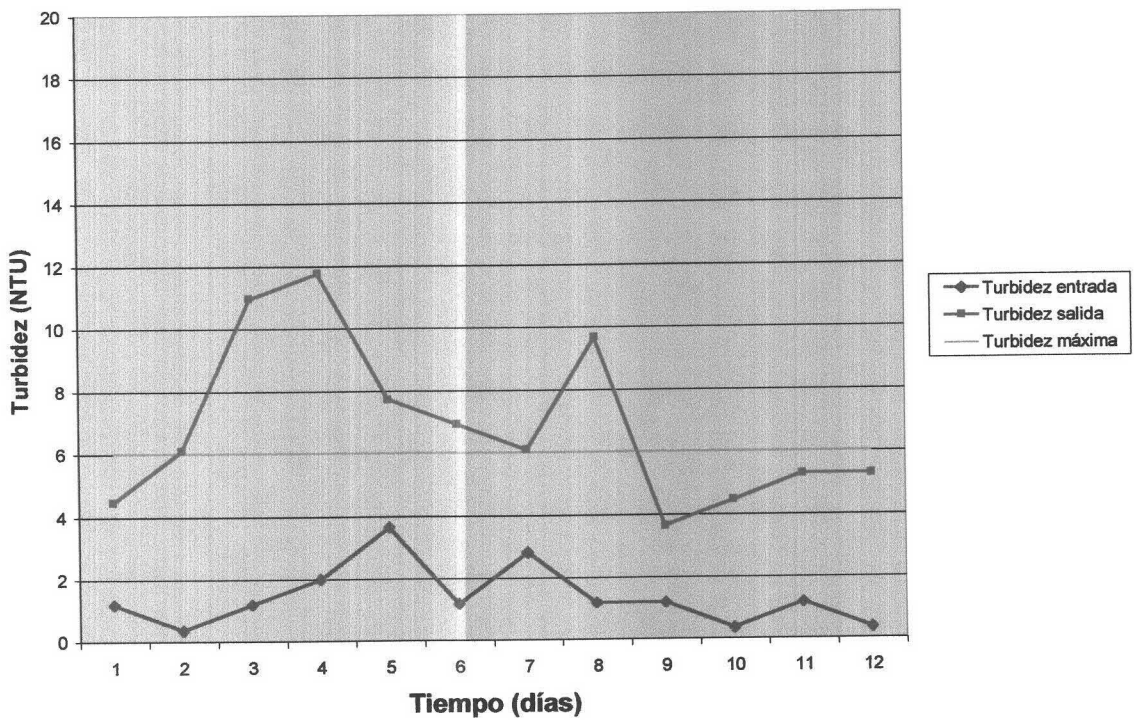


Fig. VI.22. Turbidez para $Ch = 39 \text{ m}^3/(\text{m}^2\cdot\text{d})$ y $Cs = 5,5 \text{ KgNO}_3/\text{m}^2/\text{d}$ (Valor medio nitrato entrada=142 mg/l)

Los resultados obtenidos para la carga superficial de $7 \text{ kg NO}_3^-/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ se muestran en las figuras VI.23. y VI.24.

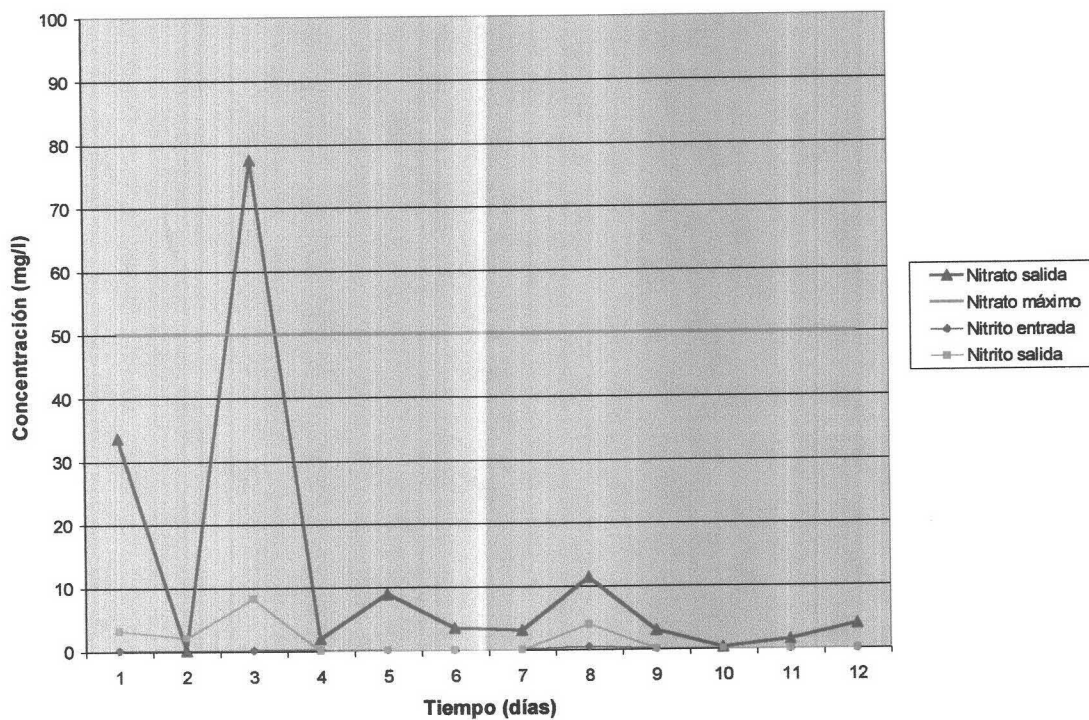


Fig. VI.23. Concentración de nitrato para $Ch = 39 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ y $Cs = 7 \text{ KgNO}_3^-/\text{m}^2/\text{d}$ (Valor medio nitrato entrada=181 mg/l)

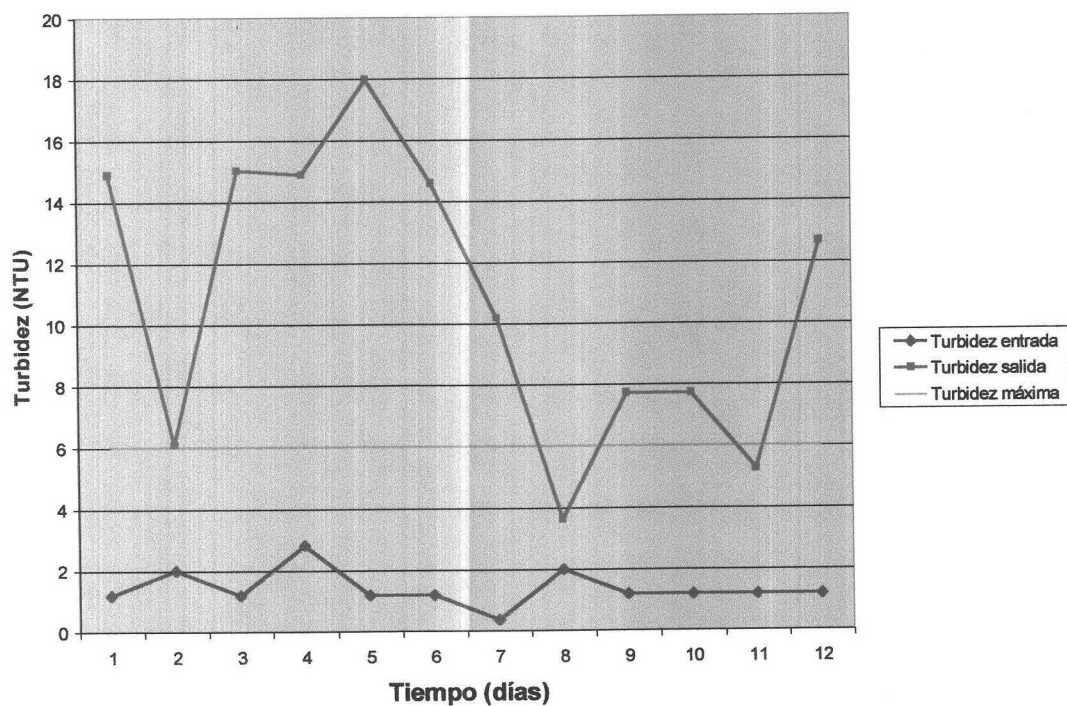


Fig. VI.24. Turbidez para $Ch = 39 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ y $Cs = 7 \text{ KgNO}_3^-/\text{m}^2/\text{d}$ (Valor medio nitrato entrada=181 mg/l)

Para este ensayo, la concentración de nitrato en el agua de salida se encontraba prácticamente durante todo el período por debajo de 10 mg/l a excepción de casos puntuales en los cuales la concentración de salida se elevó debido a un mal funcionamiento en la dosificación de etanol (atasco en el tubo de entrada). El valor medio de la concentración de nitrito fue de 1,5 mg/l, valor inferior a los obtenidos para los ensayos anteriores.

Nuevamente los valores de turbidez se vieron incrementados (Figura. VI.24.) para este ensayo, estando muy por encima de los 6UNT marcadas por la legislación como valor máximo admisible. Esto obligaba a realizar tratamientos posteriores al efluente obtenido.

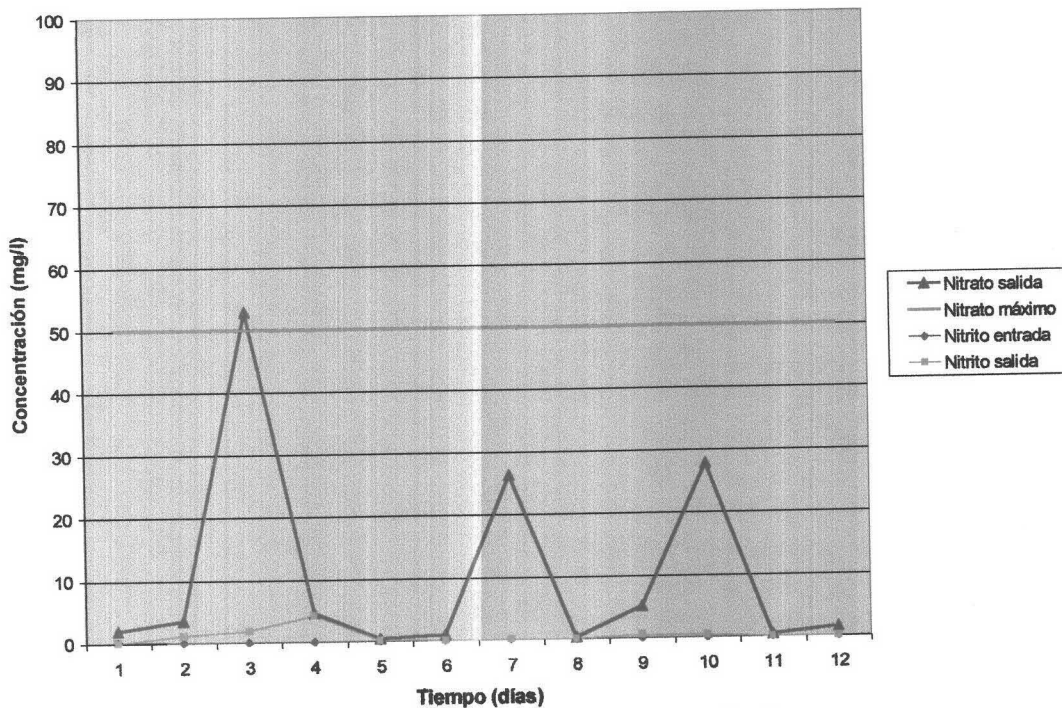


Fig. VI.25. Concentración de nitrato para $Ch = 39 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ y $Cs = 9 \text{ KgNO}_3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ (Valor medio nitrato entrada=232 mg/l)

Incrementando la carga superficial a $9 \text{ kg NO}_3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ el nitrato en el agua de salida se encontraba normalmente por debajo de 5 mg/l (Fig.VI.25.), excepto nuevamente en situaciones puntuales en las que de nuevo se observaron oclusiones en el tubo de dosificación de fuente de carbono, concretamente en el punto de entrada a la planta, donde tomaba contacto con el influente. Estas oclusiones fueron debidas a un

desarrollo importante de biopelícula en el punto de entrada a la columna que ocluía toda la sección del tubo de dosificación.

El nitrito en el agua de salida presentaba concentraciones muy próximas al máximo permitido, sin embargo estos valores, que oscilaban en torno a 0,7 mg/l (los más bajos de todos los ensayos realizados en planta semi-técnica), no presentaban problemas a la hora de eliminarlos del agua tratada.

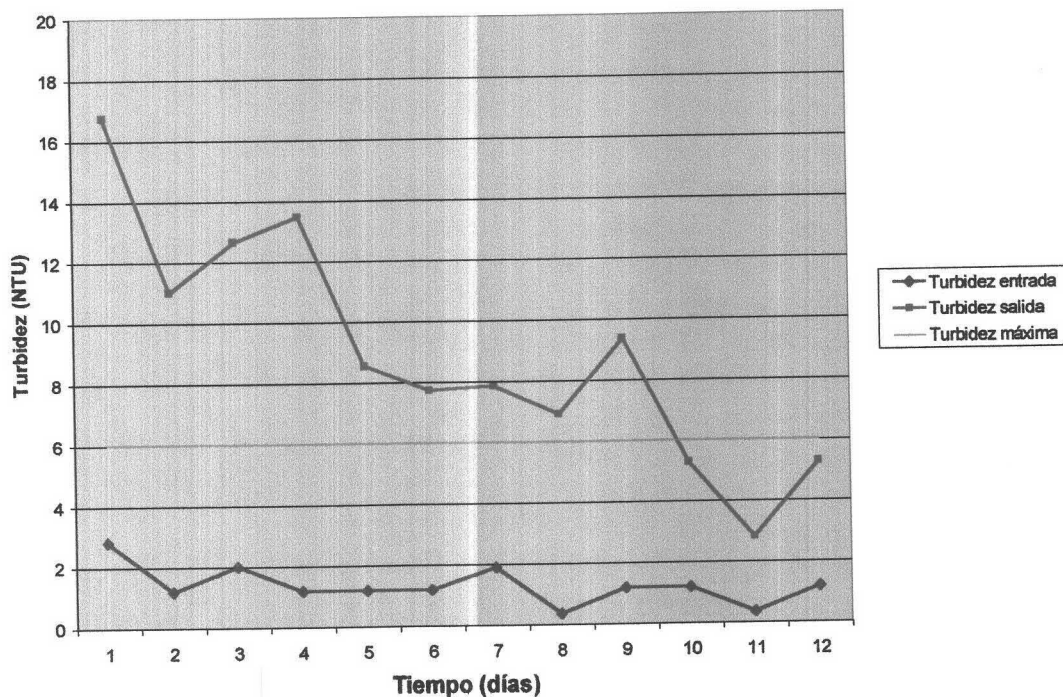


Fig. VI.26. Turbidez para $Ch = 39 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ y $Cs = 9 \text{ KgNO}_3^-/\text{m}^2/\text{d}$
(Valor medio nitrato entrada=232 mg/l)

Igual que sucedió para las cargas superficiales de 5,5 y 7 kg $\text{NO}_3^-/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$, el valor medio de la turbidez en el agua de salida se encontró por encima del máximo permitido por la legislación (Figura VI.26), reflejándose de este modo un incremento constante, comportamiento diferente a los observados en los ensayos con variación de carga hidráulica.

Nuevamente se pudo apreciar un ajuste de las concentraciones de nitrato en el agua tratada a una curva polinómica ($r^2 = 0.896$) de tipo cóncavo, sin embargo los valores que trazan la curva no presentaban grandes diferencias entre ellos, por lo que la

capacidad para eliminar nitrato del agua contaminada no se afectaba de forma muy significativa por las variaciones de carga superficial, al contrario de lo presentado para los incrementos de carga hidráulica (Figura VI.27).

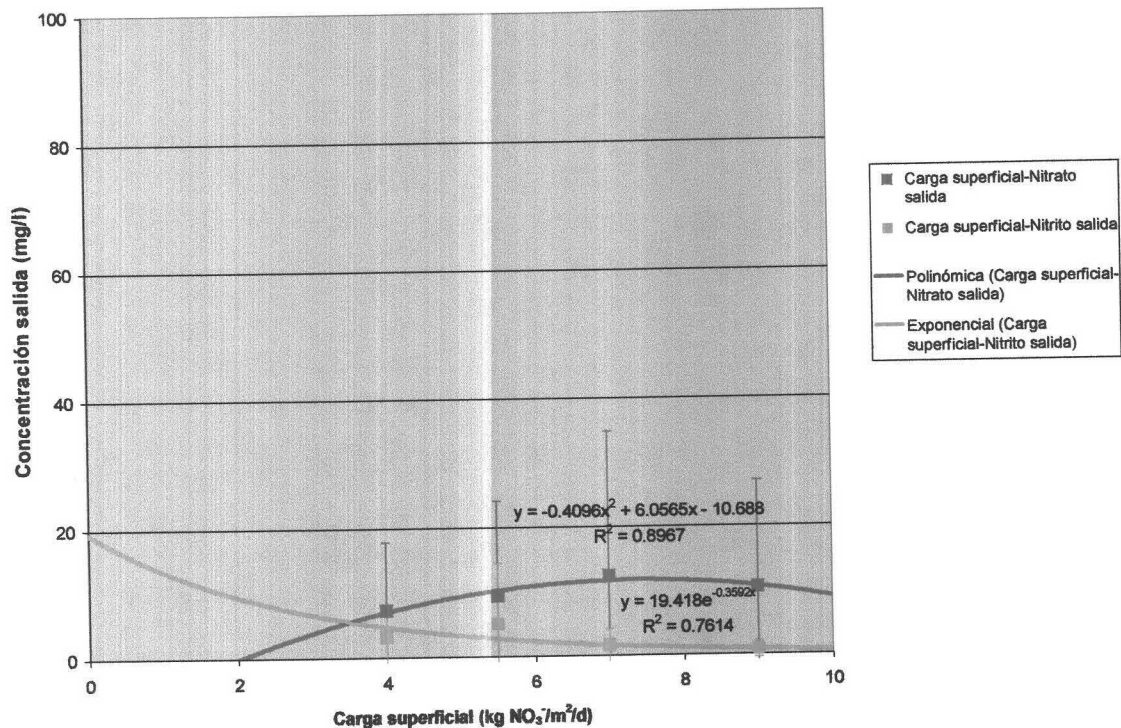


Fig. VI.27. Relación entre la carga superficial y las concentraciones de nitrato y nitrito en el efluente para una carga hidráulica de 39 m³/m²/d

El comportamiento del nitrito para estos ensayos se ajustó a una curva exponencial ($r^2 = 0.76$) observándose un descenso en las concentraciones medias de este anión en el agua de salida conforme se incrementaba la carga superficial.

Para cualquiera de las cargas superficiales ensayadas, el rendimiento del sistema fue adecuado, encontrándose el valor medio de la concentración de nitrógeno total por debajo del límite máximo permitido por la legislación (11mg N/l). Estos datos indican una buena adaptación del sistema a los incrementos de carga superficial, siendo incluso adecuado el ensayo de mayores valores de carga. Sin embargo atendiendo a que las concentraciones de nitrato en el influente para estos ensayos oscilaban en torno a 230 mg/l, valores que podemos considerar como elevados y poco frecuentes, no parecía adecuado seguir aumentando estos valores.

Representando la relación entre la carga superficial y la turbidez de salida en el efluente (Figura VI.24.), puede observarse como ésta aumenta al incrementar la carga superficial debido a que se produce un desprendimiento de la biopelícula; este desprendimiento es debido al rápido crecimiento de los microorganismos cuando incrementan las concentraciones de nitrógeno y de carbono.

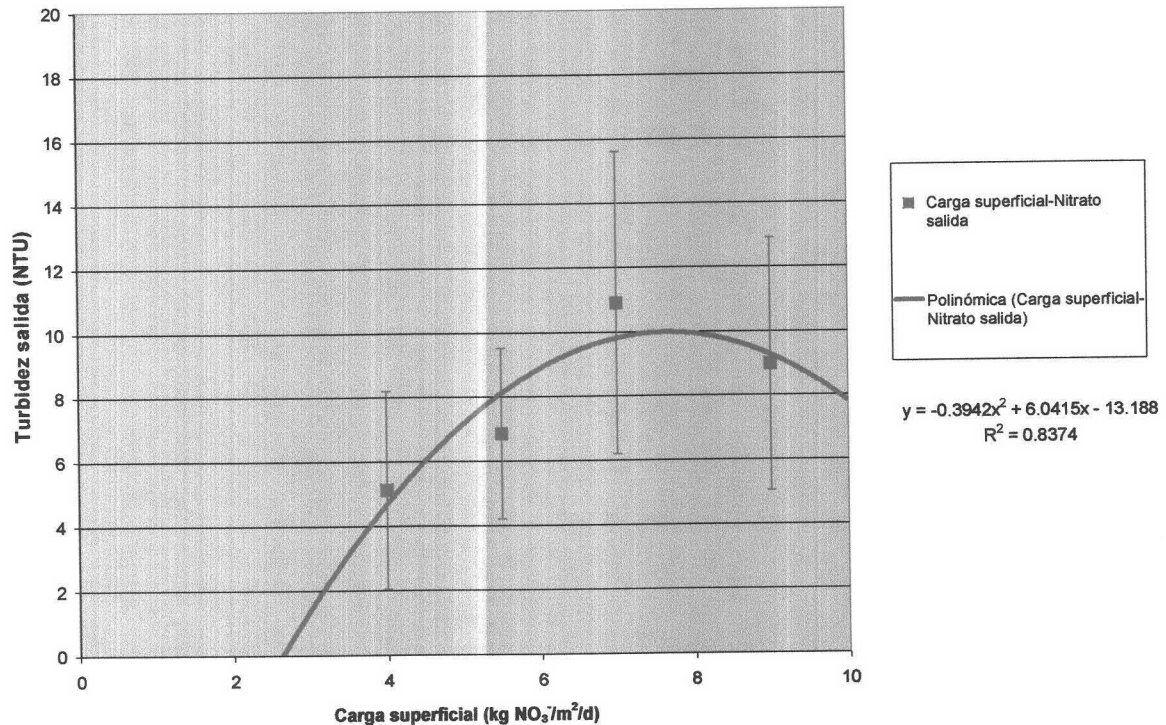


Fig. VI.28. Relación entre la carga superficial y la turbidez del efluente para una carga hidráulica de 39 m³/m²/d

Para cargas superficiales por encima de 5 kg NO₃⁻/(m²·d), el valor de la turbidez se encuentra por encima del máximo permitido por la legislación, siendo necesario tratar el agua a la salida del filtro sumergido para su empleo como agua potable.

Estos valores ponen de manifiesto que la carga superficial no parece ser limitante en cuanto al rendimiento del sistema pero sí en lo que respecta a la turbidez del agua de salida, ya que se produce un desprendimiento de la biopelícula cada vez mayor al incrementar la carga superficial.

VI.4.3.- Recuperación tras los lavados

Estudiando las necesidades de lavado para las diferentes cargas hidráulicas y superficiales ensayadas se observó que éstas aumentaron para cargas hidráulicas superiores a $20 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$, pasando el intervalo de lavados de 12 a 7 días y para la carga hidráulica de $39 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ a 4 días. Para las cargas superficiales, las necesidades se incrementaron a partir de la carga de $7 \text{ kg NO}_3^-/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ pasando el intervalo de 4 a 2 días.

Si se representa el comportamiento medio del rendimiento del sistema en eliminación de nitrógeno total frente a los lavados se obtiene la siguiente gráfica (Fig. VI.29.).

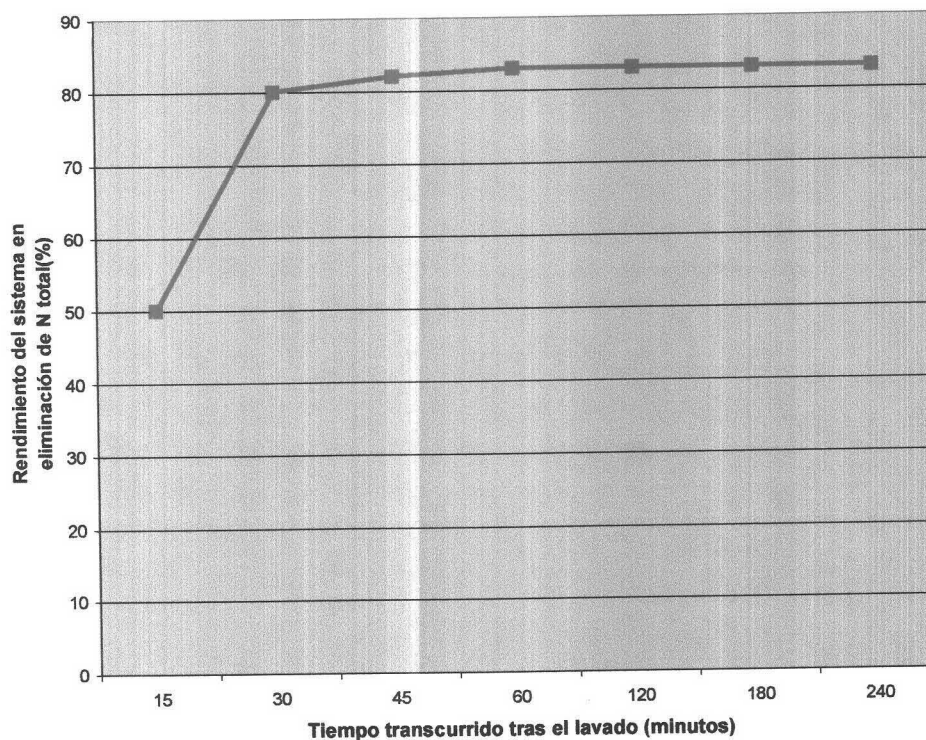


Fig. VI.29. Recuperación del sistema tras los lavados

Tal y como indica la figura VI.28., el rendimiento del sistema sufrió una disminución cercana al 30% tras el lavado, pero se recuperó de inmediato no suponiendo esto más de 30 minutos tras la puesta en marcha. Tras este tiempo el rendimiento se mantuvo estable para todas las cargas hidráulicas y superficiales ensayadas.

VI.4.4.- Comportamiento de la DQO

Representando la relación entre la DQO media en el agua de salida y la carga hidráulica y superficial se obtuvieron los siguientes resultados (Figuras VI.30. y VI.31.):

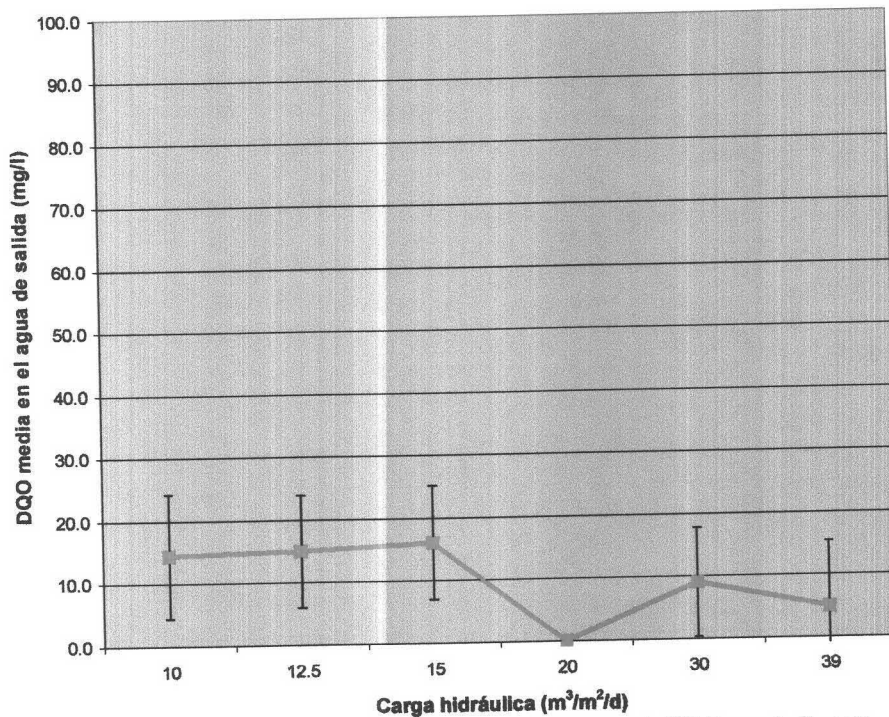


Fig. VI.30. Relación entre la carga hidráulica y la DQO en el efluente para una entrada media de nitrato de 100 mg/l.

Los resultados obtenidos para la DQO del agua de salida en relación con la carga hidráulica reflejaron un comportamiento similar a los de la turbidez. Para cargas hidráulicas iguales o inferiores a $15 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ el valor medio de la DQO del efluente se encontraba en torno a 15 mg/l, sufriendo un incremento, aunque leve, conforme se incrementaba la carga hidráulica; a partir de $15 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$, la DQO descendía a valores inferiores a 10 mg/l.

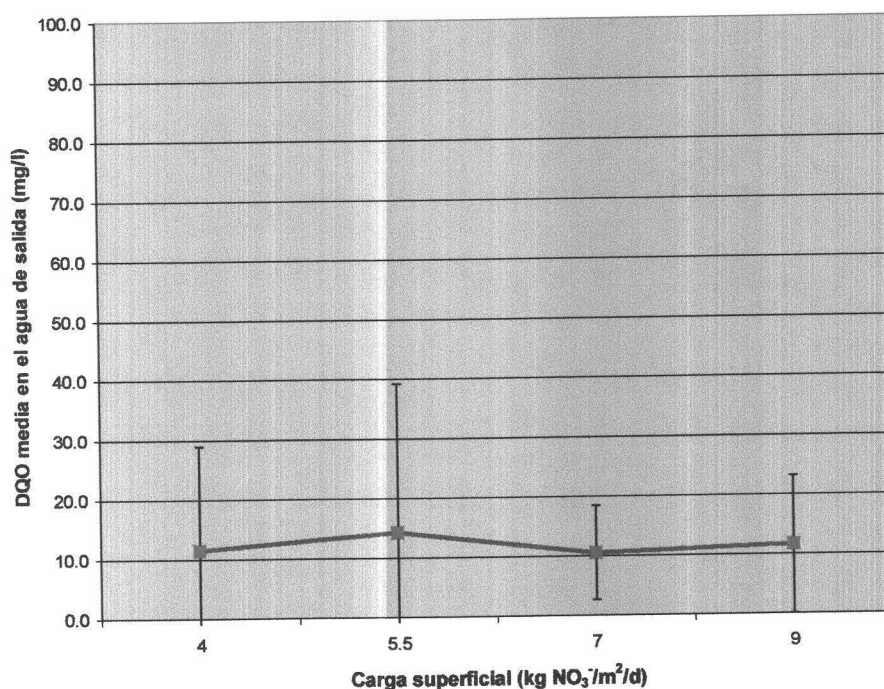


Fig. VI.31. Relación entre la carga superficial y la DQO en el efluente para una carga hidráulica de 39 m³/m²/d.

Según puede comprobarse en la figura VI.31., el comportamiento de la DQO en el agua de salida en relación con la carga superficial es prácticamente estable, no influyendo prácticamente ésta en los resultados de la DQO del efluente.

VI.4.5. Resultados de la identificación taxonómica.

Mediante la metodología realizada, se obtuvo un fragmento amplificado de tamaño en torno a 1.5 Kb tanto a partir de lisados celulares como a partir de ADN genómico. Las secuencias parciales del fragmento obtenido fueron las siguientes:

Secuencias parciales del rADN 16S de la cepa IA2:

```
>IA2-fD1 (404 nucleótidos)
TTTGGAAATTTTCGTTTTCCATTTAACGCTGGCGGCATGCTTTACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGCCG
CAAGGTGCTGACGAGTGGCGAACGGGTGAGTTATGCATCGGAACGTGCCAGTCGTGGGGGATAACGCAG
CGAAAGCTGTGCTAATACCGCATAACGATCTATGGATGAAAGCGGGGGACCGTAAGGCCTCGCGCGATTGG
AGCGGCCGATGTCAGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGCCAACGATCTGTAGCTGGTCTG
AGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTT
TGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGCAGGAAGAAGGCCTT
```

```
>IA2-rD1 (380 nucleótidos)
CATTTGCACCTTCCGATACGGCTACCTTGTACGACTTCACCCCAGTCACGAACCCCGCCGTGGTAATCG
CCCTCCTTGC GGTTAGGCTAACTACTTCTGGCGAGACCCGCTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAA
GACCCGGGAACGTATTCACCGTGACATGCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAG
TTGCAGACTGCGATCCGGACTACGACCGGCTTTATGGGATTGGCTCCCCCTTGC GGGTTGGCTGCCCTTT
GTACCGGCATTGTATGACGTGTGTAGCCCCACCTATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCT
TCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCCCATTA
```

Resultados de la comparación con secuencias depositadas en el banco de datos EMBL:

Mejores resultados:

1. Secuencia con el cebador fD1:

Nº acceso EMBL	Cepas de la especie:	Porcentaje de identidad del rADN 16S con la cepa IA2
AF078770	<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i>	99,22%
AF078768	<i>Hydrogenophaga taeniospiralis</i>	98,70%
AF019073	<i>Hydrogenophaga palleronii</i>	98,44%
AF078769	<i>Hydrogenophaga palleronii</i>	98,44%
AB021420	<i>Hydrogenophaga flava</i>	98,19%
AF078771	<i>Hydrogenophaga flava</i>	98,19%

2. Secuencia con el cebador rD1:

Nº acceso EMBL	Cepas de la especie:	Porcentaje de identidad del rADN 16S con la cepa IA2
AF078771	<i>Hydrogenophaga flava</i>	99,7%
AB021420	<i>Hydrogenophaga flava</i>	99,2%
AF078770	<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i>	99,2%
AF019037	<i>Hydrogenophaga</i> sp.	98,1%
AF078768	<i>Hydrogenophaga taeniospiralis</i>	97,6%
AB021387	<i>Pseudomonas spinosa</i>	97,6%

En conclusión, la secuencia parcial del gen codificante del rARN 16S de la cepa IA2 tiene una identidad muy elevada (>99%) con especies del género *Hydrogenophaga*, siendo *H. pseudoflava* la especie para la que se ha obtenido el porcentaje más elevado.

VII.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

VII.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

El uso indiscriminado de fertilizantes en la agricultura es consecuencia de la contaminación de las aguas subterráneas, debido a la alta solubilidad de compuestos como el nitrato. Esta contaminación difusa afecta a grandes áreas (Burkart, *et al*, 1999), viéndose especialmente afectados aquellos pequeños núcleos de población que emplean las aguas subterráneas como único recurso hídrico para la obtención de agua de abastecimiento.

Los escasos recursos económicos de estas poblaciones, demandan el desarrollo de una tecnología viable tanto técnica como económicamente y que permita solucionar la carencia de agua potable, como consecuencia de una concentración elevada de nitrato en el agua subterránea. En muchas ocasiones estos problemas en los que el agua sobrepasa los 50 mg NO_3^- /l, normalmente de tipo puntual, pueden encontrar su solución mediante un sistema móvil, garantizándose en todo momento la disponibilidad de agua potable.

La biodesnitrificación ha demostrado ser una tecnología que presenta ciertas ventajas frente a otras aplicables en la eliminación de nitrato (Dahab, 1987). Es un sistema selectivo, no genera salmueras de difícil gestión y precisa menores costes tanto de primera instalación como de explotación. Sin embargo esta tecnología es mejorable en algunos aspectos, principalmente en el diseño del sistema, de modo que se pueda montar sobre soporte móvil. Esto permitiría solucionar los problemas puntuales de contaminación que dejan sin agua potable a pequeños núcleos de población.

Diferentes sistemas como Reactores USB (Green, *et al*, 1994), lagunas (Baker, 1998), lechos fluidificados (Lazarova, *et al*, 1994), Biodiscos (Mohseni-Bandpi and Elliott, 1998) o membranas semipermeables (Mansell and Schroeder, 1998) se han aplicado a la eliminación de nitrato de aguas subterráneas, siendo el sistema de filtros sumergidos uno de los más empleados (Gómez *et al*, 2000b). En todos ellos es necesario controlar el tipo y concentración de fuente de carbono que se adiciona, la concentración de oxígeno del influente, el pH o la temperatura, sin embargo la biopelícula es el principal elemento a tener en cuenta a la hora de mejorar el proceso (Gómez *et al*, 2000a).

Clásicamente estos sistemas se han inoculado empleando Licor Mezcla procedente del reactor biológico de fangos activos de una Estación Depuradora (Mansell and Schroeder, 1998; Mohseni-Bandpi and Elliott, 1998; Gómez *et al*, 2000b). Esta forma de inocular, como se ha indicado en la investigación de choque, presenta como problema la posible presencia de patógenos en el agua tratada y la formación de biopelículas heterogéneas que tienen rendimientos inferiores al empleo de la inoculación selectiva.

Previo a la inoculación selectiva, se hace preciso seleccionar el microorganismo más adecuado para llevar a cabo este proceso, debiendo realizar esta fase de la investigación a escala de laboratorio, tal como se ha hecho en la investigación de choque. Una vez seleccionada la bacteria desnitrificante, el proceso debe aplicarse a escala semi-técnica, siendo necesario este paso para lograr definir los parámetros de diseño de esta tecnología. En nuestro caso la bacteria seleccionada fue *Ag. radiobacter*, sin embargo la aplicación de este microorganismo en un sistema de tratamiento de agua destinada a abastecimiento, obliga a asegurarnos de la auténtica identidad de la bacteria empleada.

Una biopelícula formada sobre un soporte fijo, es la forma de mantener en contacto el agua a tratar con una alta concentración de microorganismos activos, facilitando así el tratamiento del efluente en un menor tiempo. Sin embargo esta estructura biológica que permite a los microorganismos asociarse a un microambiente favorable (Watnick and Kolter, 2000), puede ser arrastrada por el flujo del agua o bien parte de sus componentes pueden pasar al agua a modo de vida libre. Esto obliga a trabajar con microorganismos que no sean patógenos, asegurando en todo momento la calidad sanitaria del agua y evitar riesgos de tipo epidemiológico.

Debido a la baja fiabilidad del método bioquímico empleado para la identificación bacteriana (75%), debemos profundizar más en el conocimiento de la bacteria seleccionada como inoculante, asegurando de este modo su correcta identidad. Esto nos lleva al empleo de los métodos de amplificación y secuenciación del gen codificante del ARN ribosómico 16S con una fiabilidad del 99%. Tras estos ensayos la cepa bacteriana se reveló como *Hydrogenophaga pseudoflava* perteneciente a la familia Comamonadaceae incluida en la taxonomía antigua en el grupo de los *Pseudomonas* (Buchanan, and Gibbons 1984). Este tipo de microorganismos son frecuentes en el agua residual urbana, donde proliferan tanto en

presencia de oxígeno como en anoxia (desnitrificación) empleando diversas fuentes de carbono (Lemmer *et al*, 1997).

Son bacterias que se caracterizan por su tendencia a unirse a soportes formando biopelículas (Lemmer *et al*, 1998), de ahí su aislamiento a partir de biopelículas desnitrificantes formadas con licor mezcla procedente del reactor biológico de una estación depuradora. Su hidrofobicidad y capacidad de adherencia hace que se encuentren en espumas y formando agrupaciones a modo de *Zooglea* en los procesos biológicos de fangos activos (Lajoie *et al*, 2000). No se conoce como bacteria patógena humana, ni animal o de plantas, por lo que unido a su capacidad de formar biopelículas estables y su alta actividad desnitrificante, la convierten en un inoculante ideal para realizar una inoculación selectiva aplicada en el tratamiento de aguas destinadas a abastecimiento.

Uno de los problemas de este tipo de sistemas es la presencia de parte de la fuente de carbono dosificada en el efluente. Esta concentración de fuente de carbono puede considerarse como una pérdida en el proceso que podría reducirse, sin embargo un descenso en la dosificación de fuente de carbono, llevaría a descender la relación C/N en el influente y con ello caería el rendimiento (Gómez , 1998).

En todos los sistemas biológicos aplicados en la eliminación de nitrógeno de aguas subterráneas, queda un remanente de fuente de carbono dosificada (Mohseni-Bandpi and Elliott, 1998; Gómez *et al*, 2000b). Esta concentración final se incrementa con la carga hidráulica, al reducirse el tiempo de retención hidráulico del influente (Dahab and Lee, 1988). En nuestra investigación se pudo apreciar leves variaciones de la D.Q.O. (Demanda Química de Oxígeno), tanto con la carga hidráulica como con la carga superficial. Sin embargo este parámetro no solo refleja un aumento en la cantidad de etanol en el efluente tratado, sino que también contabiliza la materia orgánica desprendida desde la biopelícula. Consecuencia de esto fue la correlación existente entre la turbidez del agua tratada y la D.Q.O. en los ensayos de carga hidráulica, lo cual ponía de manifiesto que este parámetro mayoritariamente reflejaba la presencia de restos de biopelícula más que de etanol sobrante. Este comportamiento fue reflejado por otros investigadores, como es el caso de Woodbury *et al* (1998).

Atendiendo a esto se realizó un seguimiento de la concentración de etanol en el efluente, corroborando que efectivamente se incrementaban sus pérdidas con el aumento principalmente de la carga hidráulica, pero descendía con el aumento de la carga superficial, en los ensayos en los que se mantenía constante el caudal de trabajo. Las concentraciones de salida no fueron sin embargo muy importantes, no superando en el peor de los casos el 5% del total dosificado. Esto llevó a no utilizar el parámetro de D.Q.O. para el control de la presencia de fuente de carbono sobrante, siendo la información que aportaba semejante a la proporcionada por la turbidez del agua. Sus valores sin embargo dan idea de las necesidades de posteriores tratamientos del efluente obtenido.

La información que se puede desprender de estos datos, lleva a plantear en el diseño de una planta a escala industrial, la utilización de post-tratamientos que eviten las alteraciones que se puedan dar en cuanto a la calidad del agua por la aplicación de procesos biológicos. Estos tratamientos deberán ir destinados a la eliminación de las concentraciones remanentes de fuente de carbono y retención de los restos de biopelícula desprendidos.

Uno de los parámetros más determinativos a la hora de diseñar un sistema de biopelícula es la carga hidráulica. Este parámetro define el tiempo de retención hidráulica del influente en el interior del sistema, el cual presenta gran importancia en los procesos biológicos ya que define el tiempo de contacto entre los microorganismos y el agua a tratar. Debido a la alta carga microbiana que se puede mantener en los sistemas de biopelícula fija, el tiempo de retención hidráulica puede reducirse considerablemente con respecto a los procesos de cultivo en suspensión, sin embargo un elevado caudal puede ser causa de un arrastre de la biopelícula, lo cual empeora las características finales del efluente obtenido y reduce los rendimientos del sistema. Es por lo tanto importante definir cual es la carga hidráulica más adecuada para trabajar, de modo que se consiga el menor tiempo de retención que permita eliminar la máxima cantidad de nitrato, a la vez que el caudal establecido no arrastre la biopelícula.

Atendiendo a esto, parece lógico que los sistemas de biopelícula experimenten una caída de los rendimientos conforme se aumenta el caudal de trabajo. Esto ha sido apreciado tanto para sistemas de biodiscos (Mohseni-Bandpi and Elliott, 1998) como para filtros sumergidos (Dahab and Lee, 1988; Volokita et al, 1996), sin embargo en estos

comportamientos pueden influir otros parámetros como tipo de relleno o de biopelícula formada.

En los ensayos realizados por Volokita et al (1996) se apreciaba una importante caída del rendimiento para cargas hidráulicas superiores a $1.0 \text{ m}^3/\text{m}^2 \text{ día}$ (12 horas de Tiempo de Retención Hidráulica), valores que obligarían a la construcción de plantas que ocuparían una superficie excesiva si se trasladan a escala industrial. Estos ensayos fueron realizados empleando papel como soporte, un material que permite un escaso desarrollo de biopelícula a la vez que esta es fácilmente barrida por el flujo del agua. El empleo de otros materiales como los aplicados por Dahab and Lee, (1988) permitían reducir el tiempo de retención hidráulica hasta valores de 9 horas sin que se afectase el rendimiento final, pero encontrando en los filtros sumergidos un desplazamiento de la actividad biológica hacia zonas más altas de la columna. Estos resultados fueron apreciados por Gómez (1998), sin embargo existía el riesgo de contar en las zonas altas de la columna con microbiota reductora de nitratos que incrementase las concentraciones de nitrito en el agua tratada, debido a la inoculación no selectiva del biofiltro.

Mediante esta investigación, se alcanzaron rendimientos óptimos a valores de $39 \text{ m}^3/\text{m}^2 \text{ día}$ (0.9 horas TRH) con un comportamiento que se ajustaba a un polinomio de segundo grado convexo. Es decir inicialmente el sistema perdía rendimiento en cuanto a la capacidad de eliminar nitrato, pasando para valores superiores a $21.3 \text{ m}^3/\text{m}^2 \text{ día}$ a incrementarse el rendimiento global. Un comportamiento semejante fue observado por Woodbury *et al* (1998) en un sistema de doble filtro sumergido empacado con material poroso, justificando en esta ocasión un mayor rendimiento por una mayor actividad en la biopelícula al contar esta siempre con concentraciones de nitrato que la mantenían activa.

Las concentraciones de nitrito se ajustaban a una curva polinómica de segundo grado, pero de signo contrario (cóncava) lo que ponía de manifiesto una pérdida en la actividad biológica en la parte inicial de la curva (caída de la concentración de nitrito y aumento de la de nitrato) y un aumento en la segunda parte de la curva, no correspondiéndose la mayor concentración de nitrito con la presencia de reductores de nitrato, al ser la inoculación de tipo selectivo. Los incrementos de la carga hidráulica suponían un mayor aporte de nutrientes (de forma global) al interior de la columna, lo cual permitiría desarrollar parte activa de la

biopelícula a lo largo de todo el cilindro, haciendo este efectivo en toda su altura. De este modo un aumento en la carga hidráulica permitía la formación de biopelículas más estables, sobre material cerámico, empleando como microorganismo *H. pseudoflava*, debido a las concentraciones más altas de nutrientes en el interior de la columna.

Estos datos de mayor estabilidad pueden verse corroborados por el comportamiento de la turbidez del sistema, la cual se incrementaba en la columna con la carga hidráulica, hasta alcanzar un punto para el cual se reduce considerablemente el desprendimiento de biopelícula, principal causante de la turbidez del agua.

Los incrementos en la carga hidráulica suponían un aumento en las cantidades globales de nutrientes que entraban en la columna por unidad de tiempo. Estos se traducían en un incremento de la carga superficial ($\text{Kg NO}_3^-/\text{m}^2 \text{ día}$), lo cual puede lograrse igualmente a caudal constante, mediante un incremento de la carga contaminante. De este modo se varió de una carga superficial de $4 \text{ Kg NO}_3^-/\text{m}^2 \text{ día}$ hasta valores de $9 \text{ Kg NO}_3^-/\text{m}^2 \text{ día}$.

El comportamiento del sistema para estos ensayos se ajustaba nuevamente a una curva polinómica convexa con punto de inflexión en $7.4 \text{ Kg NO}_3^-/\text{m}^2 \text{ día}$, para el cual se alcanzaban valores medios de 9.8 mg/l de nitrato en el efluente tratado. Tanto para mayores como menores cargas, los valores medios obtenidos fueron inferiores, pero con poca variación, no siendo éste superior a 3 mg/l . Esto pone de manifiesto que para las cargas superficiales ensayadas el sistema permanece prácticamente inalterable en cuanto a eliminación de nitrato. Si atendemos a los valores de eliminación de nitrito, estos se ajustan a una curva de tipo exponencial, descendiendo la presencia de nitrito con el incremento de la carga superficial, lo cual unido a los valores de nitrato reflejan un ligero incremento en el rendimiento con la carga.

Estos incrementos del rendimiento con la carga tanto hidráulica como superficial, al contrario de lo que sucede normalmente para otros sistemas de biopelícula, son el resultado de un mayor desarrollo de biomasa que coloniza todo el volumen del reactor. Se consigue de este modo trabajar con todo el volumen útil de la columna, manteniendo los rendimientos óptimos para mayores cargas de nitrato y mayores caudales.

Los incrementos de la carga tanto hidráulica como superficial, debido a la mayor producción de biomasa en el sistema, tenían como efecto directo un incremento en las frecuencias de lavado. Estos incrementos fueron más significativos para los ensayos con incremento de carga, sin embargo las necesidades de accionar el sistema de limpieza distan mucho de las observadas en aquellos filtros sumergidos que trabajan con aguas residuales. Otro de los problemas derivado del lavado del filtro es la recuperación de la actividad desnitrificante tras los lavados, fenómeno que como era de esperar se producía tras el arrastre de la biomasa causante de la pérdida de carga. Este efecto negativo era rápidamente amortiguado tras el accionamiento del sistema, suponiendo por lo tanto los lavados tan solo un problema de costes de explotación al ser su frecuencia mayor y no una pérdida de rendimiento en el sistema.

Debido a estos resultados obtenidos con la inoculación selectiva, se permite la fabricación de biorreactores de menor volumen, lo cual facilita su montaje sobre soporte móvil. Igualmente se pueden reducir los costes de explotación para estos sistemas, debido principalmente a la mayor rentabilización que se realiza de la fuente de carbono dosificada. Esta es consumida en la biopelícula selectiva, exclusivamente por microorganismos desnitrificantes, lo cual supone una mayor eliminación de nitrógeno que la obtenida en sistemas de biopelícula más heterogéneos.

En estas condiciones de trabajo, uno de los factores limitantes fue la turbidez del agua, la cual se incrementó con la carga hidráulica, pero se vio en un principio reducida ante el aumento global de nutrientes que entran en el sistema, lo cual es resultado del desarrollo de biopelícula estable a lo largo de todo el biorreactor. Los incrementos de carga de nitrato favorecen esta colonización completa del biorreactor, sin embargo, a pesar de que esto influye en los mejores rendimientos, facilita el arrastre de la biopelícula de la zona alta del sistema por el flujo del agua. Atendiendo a esto se seleccionó como carga de nitrato para el diseño la de $9 \text{ Kg. NO}_3^- / \text{m}^2 \text{ día}$, la máxima ensayada. Valores más altos de carga superficial tendrían como consecuencia directa un aumento en la turbidez, obligando a tratamientos posteriores más exhaustivos, razón por la cual no se incrementó esta variable.

Debido al arrastre de biomasa sufrido en el sistema trabajando con $9 \text{ Kg. NO}_3^- / \text{m}^2 \text{ día}$ de carga superficial y con $39 \text{ m}^3 / \text{m}^2 \text{ día}$ de carga hidráulica, se decidió asegurar una menor

turbidez en el agua tratada, mediante un descenso del caudal de trabajo. De las diferentes cargas hidráulicas ensayadas se seleccionó la inmediatamente inferior a la máxima, $30 \text{ m}^3/\text{m}^2$ día, con la cual se pasó al diseño del sistema a escala industrial.

Atendiendo a las características finales del efluente obtenido, principalmente a los valores de turbidez y D.Q.O. se podía concluir con la necesidad de realizar post-tratamientos que redujesen la presencia de microorganismos así como de materia orgánica disuelta. Esto se podría conseguir con un proceso de desinfección de tipo oxidativo (cloración mediante hipoclorito) que a su vez garantizaba la ausencia total de nitrito en el efluente tratado. Queda aún por reducir los valores de turbidez, bajo aquellos permitidos por la legislación (6 UNT), para lo cual se hace necesario una filtración adecuada, mediante filtro de arena.

Con todas estos elementos se pretende formar una unidad de tratamiento compacta que permita "in situ" no solo eliminar el nitrato del agua subterránea, sino obtener directamente agua potable en condiciones adecuadas para ser distribuida por el sistema de abastecimiento.

**VIII.- CONCLUSIONES Y
RECOMENDACIONES**

VIII.-CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Atendiendo a la discusión realizada del estudio de los resultados, se pueden extraer las siguientes conclusiones finales:

1. La inoculación selectiva elimina los problemas presentados por la inoculación realizada con licor mezcla, pues no existen patógenos en el agua tratada y se dan unos rendimientos del sistema superiores por tratarse de una biopelícula más homogénea.
2. El tipo de inoculante empleado para la formación de la biopelícula influirá en la estabilidad y actividad de ésta, condicionando los rendimientos del proceso. De los microorganismos ensayados *Hydrogenophaga pseudoflava* presentó las mejores cualidades.
3. La cepa bacteriana empleada en la inoculación del filtro sumergido condicionará la necesidad de recirculación en la puesta en marcha. Para *Hydrogenophaga pseudoflava* ésta fue de tan solo 24 horas.
4. La utilización de mezclas de microorganismos para la inoculación del filtro puede empeorar los rendimientos alcanzados con inoculantes únicos debido a fenómenos de competencia entre ellos.
5. La selección de cepas bacterianas con alto poder desnitrificante y buena capacidad para la formación de biopelículas estables para su empleo en la inoculación del filtro biológico, mejoran los parámetros de diseño así como la explotación del proceso. Para los ensayos realizados a escala semi-técnica con la cepa *Hydrogenophaga pseudoflava* se alcanzaron como valores óptimos de **carga hidráulica $30 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{d}$** y **de carga superficial de nitrato $9 \text{ Kg}/\text{m}^2\cdot\text{d}$** .
6. El incremento de la carga hidráulica y superficial suponen un incremento en la frecuencia de lavados, lo cual aumenta los costes de explotación pero no supone una pérdida de rendimiento del sistema.

7. Tanto la turbidez como la D.Q.O. incrementan con el aumento de la carga hidráulica, afectando a las características finales del efluente.

8. Atendiendo a las características finales del efluente obtenido, principalmente a los valores de turbidez, D.Q.O. y nitrito, es necesario realizar post-tratamientos que reduzcan la presencia de microorganismos, la materia orgánica disuelta, las pequeñas cantidades sobrantes de fuente de carbono y el nitrito del efluente. Estos tratamientos consisten en una desinfección y una filtración, obteniendo de esta manera agua potable.

**IX.- DISEÑO DE LA PLANTA A
ESCALA INDUSTRIAL**

IX.- DISEÑO DE LA PLANTA A ESCALA INDUSTRIAL

Partiendo de los datos obtenidos en la investigación anterior se procedió a diseñar un filtro sumergido a escala industrial con dimensiones adecuadas para su traslado sobre plataforma móvil. Dicho sistema permitirá abastecer de agua potable a una población entre 500 y 1.000 habitantes, siendo capaz de producir 1 l/sg de agua potable, la cual podrá mezclarse con agua sin tratar obteniendo caudal suficiente y cumpliendo con las exigencias legislativas. La figura IX.1. muestra un esquema de la planta diseñada.

Los parámetros de diseño considerados fueron **30 m³/m²·d de carga hidráulica** y **9 Kg NO₃⁻/m²·d de carga superficial**, deducidos de los apartados anteriores, y **1,5 m de altura de relleno** (Gómez, 1998). El filtro biológico diseñado, de forma cilíndrica, se fabricó en material de Polipropileno Homopolímero (PPH), con los espesores adecuados en función de la densidad del producto a contener (1,7 T/m³). Este filtro cuenta con un falso fondo que ocupa toda la base, a través del cual se introducirá el agua mediante unas boquillas, con una densidad superior a 50 ud/m² (Figura IX.2.), evitando así la formación de caminos preferenciales en la entrada del influente.

El diámetro del cilindro fue de 2,4 m, que es la anchura máxima admisible en un transporte por carretera en condiciones normales (es decir, sin permisos especiales). La altura máxima del conjunto es de 2,9 m, que junto con una cama de camión de 1,1, m nos da un altura de 4 m (máxima admisible para un transporte normal). Todas estas medidas adoptadas fueron necesarias para obtener un conjunto transportable en un camión normal, sin necesidad de solicitar permisos especiales, facilitando así su traslado rápido en situaciones de emergencia de suministro de poblaciones.

En la parte superior de la planta se colocó un depósito de recirculación de 25 litros de capacidad (Figura IX.3.) mediante el cual se realizará la inoculación del sistema. Una bomba de recirculación (Q = 4,4 m³/h y P = 1 m.c.a.) mantendrá el elemento inoculante en circulación introduciéndolo por el falso fondo y entrando de nuevo en el depósito por un rebosadero colocado en la parte superior del cilindro y conectado con éste.

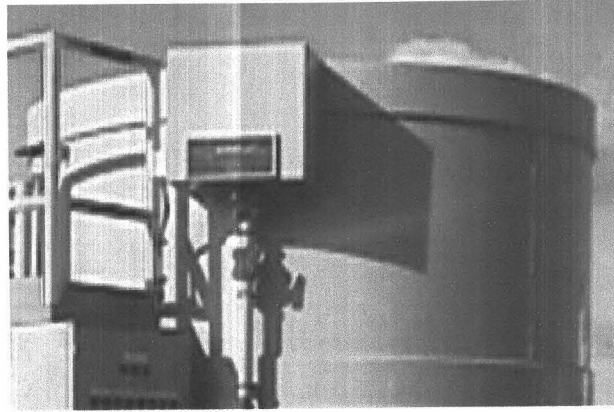


Figura IX.3.- Depósito de recirculación de 25 litros.

El agua a tratar entrará en la planta desde el punto de captación del agua subterránea a través de una tubería de 40 mm de diámetro, conectada al filtro formando ambos un sistema de vasos comunicantes, lo cual permitirá mantener el sistema inundado.

Previo a la entrada en el filtro se le dosificará la fuente de carbono necesaria (etanol), existiendo también la posibilidad de incrementar la concentración de fósforo según necesidades. Para ello se cuenta con un depósito de 50 litros de capacidad para contener etanol y fosfato (siempre y cuando éste sea necesario). La dosificación se realizará mediante una bomba dosificadora de 0,52 l/h de caudal colocada en el depósito (Figura IX.4.).

Para realizar el lavado de la planta se colocó un soplante, en una caja insonorizada para disminuir el ruido producido por el mismo, y una bomba de forma que dicho lavado se pueda realizar con aire y agua. El soplante es de émbolos rotativos de caudal $225 \text{ Nm}^3/\text{h}$ y 0,5 bar de presión (Figura IX.5.). La bomba de lavado da un caudal de $125 \text{ m}^3/\text{h}$ y 5 m.c.a. de presión (Figura IX.6.).

En la parte superior del filtro se colocó un aliviadero de seguridad preparado para su conexión con la red de alcantarillado, de forma que en caso de producirse el atasco del sistema no se produzca rebose del agua, inundando la zona donde se ubique la planta (Figura IX.7.).



Figura IX.4.- Depósito de etanol y bomba dosificadora.

Atendiendo a las características obtenidas en el efluente del filtro biológico se hace necesario realizar un tratamiento posterior para potabilizar el agua. Este tratamiento consiste en:

- Una desinfección del agua para lo que se emplearán métodos sencillos y de bajo coste, seleccionando como proceso más adecuado la cloración mediante hipoclorito sódico. Para ello se dispuso un depósito de 50 l de capacidad con una bomba dosificadora, siendo ambos de iguales características a los empleados para dosificación de etanol (Figura IX.4.). Este sistema de cloración permitirá eliminar las pequeñas cantidades sobrantes de fuente de carbono así como algunos restos orgánicos desprendidos de la biopelícula. Igualmente este sistema permitirá eliminar la concentración de nitrito del efluente situándola por debajo del límite permitido por la legislación.

- A continuación de la cloración se colocó un filtro a presión autolimpiante relleno de arena con talla efectiva de 0,55 mm y velocidad de filtración 40 m/h. Con este filtro se reducirá la turbidez y se eliminarán las partículas en suspensión, potabilizando de esta manera el agua.



Figura IX.5.- Caja de insonorización donde se encuentra instalado el soplante.

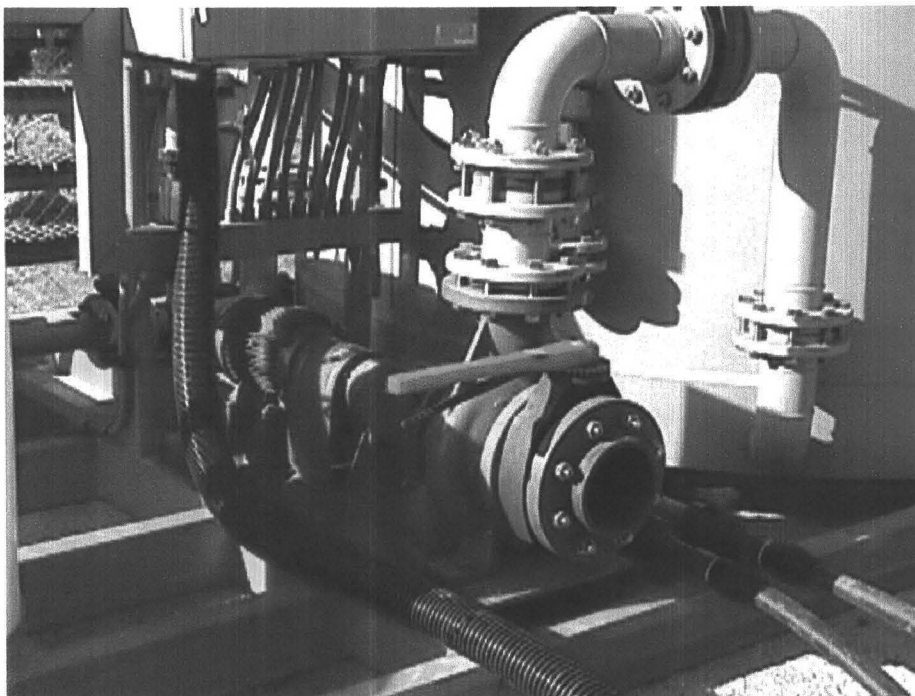


Figura IX.6.- Bomba de lavado.



Figura IX.7.- Aliviadero de seguridad conectado con la red de alcantarillado.

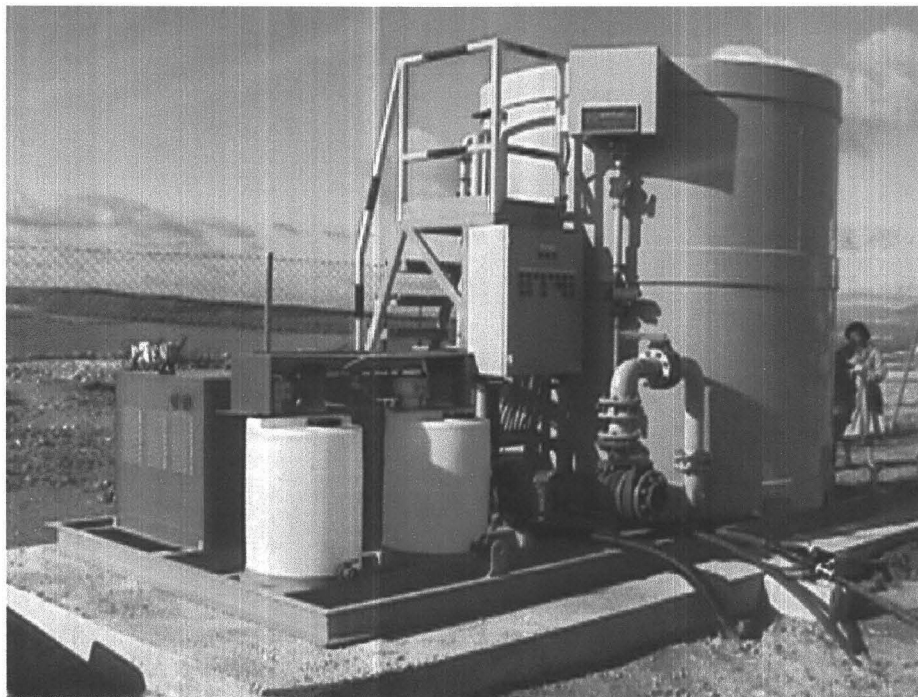


Figura IX.8.- Vista general de la planta.

**X.- LÍNEAS FUTURAS DE
INVESTIGACIÓN**

X.- LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

Atendiendo a los resultados obtenidos en esta investigación se proponen las siguientes líneas de investigación:

1. Ensayos a escala industrial, empleando la planta diseñada y construida en este trabajo de investigación, para corroborar el funcionamiento adecuado del sistema.
2. Estudio de cargas hidráulicas y cargas superficiales superiores a las consideradas en este trabajo, mediante el empleo de nuevos inoculantes que eviten los problemas encontrados en esta investigación.
3. Realizar una comparativa económica entre mejora de los parámetros de diseño del filtro y tratamientos posteriores necesarios para potabilizar el agua buscando minimizar tanto el coste de inversión como el de explotación.
4. Estudio del exopolisacárido producido por los inoculantes para mejorar la adherencia del microorganismo empleado en la inoculación, disminuyendo así la turbidez en el agua de salida del filtro y las necesidades de lavado del sistema.
5. Empleo de inoculantes modificados genéticamente buscando un mayor rendimiento y mejora en la adherencia bacteriana.
6. Estudio de la colonización de la biopelícula por la microbiota presente en el agua subterránea y su influencia en la explotación del sistema.

XI.- BIBLIOGRAFÍA

XI.- BIBLIOGRAFÍA

Las referencias bibliográficas indicadas en los apartados anteriores son las siguientes:

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.

AGRAWAL, G. D., 1999. Diffuse Agricultural Water-Pollution in India. *Water Science Technology* **39 (3)**: 33-47.

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.

ANDERSON, R.T.; ROONEYVARGA, J.N.; GAW, C.V. and LOVLEY, D.R. 1998. Anaerobic benzene oxidation in the Fe(III) reduction zone of petroleum-contaminated aquifers. *Environmental Science & Technology* **32(9)**: 1222-1229.

Anon. 1984 *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology* 9 th ed. Willians and Wilkins. Baltimore.

Anon. 1995. Libro Blanco de las Aguas Subterráneas. *Ministerio de Industria y Energía. MOPTMA.* Madrid.

Anon. 1998. LIBRO BLANCO DEL AGUA EN ESPAÑA. *Ministerio de Medio Ambiente.*

APHA, AWWA and WEF. 1992 Standard methods for the examination of water and wastewater. *18th ed. American Public Health Association. Washington, D.C.*

APTEL, P. and BUCKLEY, C.A., 1998. Tipos de operaciones de membrana. *Tratamiento del agua por procesos de membrana. Principios, procesos y aplicaciones*. McGraw Hill.

ARROYO, O.R., PARSI, E.J. and MELLER, F.H. 1991. Respuestas de la EDR (electrodialisis reversible) a los retos en el tratamiento de aguas y los métodos de recuperación. *Tecnología del Agua*, XI (87): 44-52.

BAKER, L.A. 1998. Design considerations and applications for Wetland Treatment of high-nitrate waters. *Water Science and Technology* 38(1): 389-395.

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.

BITTON, G. 1994. Wastewater Microbiology. *Wiley-Liss*. New York.

BLASZCZYK, M. 1992. Comparison of denitrification by *P. denitrificans*, *Ps. stutzeri* and *Ps. aeruginosa*. *Acta Microbiologica Palon* 41: 203-210.

BOHDZIEWICZ, J. BODZEK, M. and WASIK, E. 1999 The application of Reverse Osmosis and Nanofiltration to the Removal of Nitrates from Groundwater. *Desalination* 121: 139-147.

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.

BOURREL, S.; DOCHAIN, D.; BABARY, J.P. and QUEINNEC, I. 2000. Modeling, identification and control of a denitrifying biofilter. *Journal of process control* 10(1): 73-91.

BRAUN, C. and ZUMFT, W.G. 1992. The structural genes of the nitric oxide reductasa complex from *Pseudomonas stutzeri* are part of a 30-kilobase gene cluster for denitrification. *Journal of Bacteriology* **174**: 2394-2397.

BUCHANAN, R.E. and GIBBONS, N.E. (1984) Genus *Pseudomonas* Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. Baltimore. Williams & Wilkins.

BURKART, M.R.; KOLPIN, D.W. and JAMES, D.E. 1999 Assessing groundwater vulnerability to agrochemical contamination in the Midwest US. *Water Science Technology* **39** (3): 103-112.

CALVO, C.; GÓMEZ, M.A.; and GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. 1998. Fecal coliform-related bacterial and coliphage populations in fine lakes of southeaster Spain. *Microbiological Research*. **153**: 283-288.

CAMACHO RUBIO, F. 1999. Aplicación de la tecnología de membranas al tratamiento del agua. *Curso: Depuración de aguas residuales industriales: industrias químicas y agroalimentarias*. Almuñécar, 20 a 24 de Septiembre de 1999. Centro Mediterráneo de la Universidad de Granada.

CANTOR, K.P. 1997. Drinking Water and Cancer. *Cancer Causes & Control* **8**(3): 292-308.

CANZIANI, R.; VISMARA, R.; BASILICO, D. and ZINNI, L. 1999 Nitrogen removal in fixed-bed submerged biofilters without backwashing. *Water Science and Technology* **40**(4-5): 145.-152.

CAST, K.L. and FLORA, J.R.V. 1998. An evaluation of two cathode materials and the impact of copper on bioelectrochemical denitrification. *Water Research* **32**(1): 63-70.

CERNING, J. 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactis acid bacteria. *FEMS Microbiology* **87**: 113-130.

CERNING, J.; RENARD, C.M.G.C.; THIBAUT, J.F.; BOUILLANNE, C.; LANDUN, M.; DESMAZEAUD, M. and TOPOSIROVIC, L. 1994. Carbon source requeriments for exopolysaccharide production by Lactobacillus casei CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Appl. Environmental Microbiology* **60**: 3914-3919.

CHAMBON, P.; COIN, L. and VIAL, J. 1983. Risque pour la Santé Humaine de certains composés azotés présents normalement ou éventuellement dan l'eau de boisson: les nitrates, nitrites et composés N-nitroso (2° partie). *Eau el L'Assainiss* **440/441**: 25-33.

CHANG, C.C.; TSENG, S.K. and HUANG, H.K. 1999. Hydrogenotrophic denitrification with immobilized Alcaligenes-Eutrophus for drinking-water treatment. *Bioresource Technology* **69(1)**: 53-58.

CLIFFORD, D. and LIU, X. 1993. Biological denitrification of Spent Regenerant Brine Using a Sequencing Batch Reactor. *Water Research* **27(9)**: 1477-1484.

CONGREGADO, F.; ESPAÑOL, I.; ESPUNY, M.J.; FUSTÉ, M.C.; MANRESA, M.A.; MARQUÉS, A.M.; GUINEA, J. and SIMON-PUJOL, M.D. 1985. Preliminary studies on the production and composition of the extracellular polysaccharide synthesized by Pseudomonas sp. EPS-5028. *Biotechnology Lett.* **7**: 883-888.

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.

CORSEUIL, H.X.; HUNT, C.S.; FERREIRA, R.C.; ALVÁREZ, P.J.J. 1998. The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation. *Water Research* **32(7)**: 2065-2072.

COSTERTON, J.W.; CHENTG, K.J.; GEESEY, G.G.; LODD, T.I.; NICKET, J.C.; DASGUPTA, M. and MARRIE, T.J. 1987 Bacterial Biofilm in nature and disease. *Annual Review Microbiology* 41: 435-464.

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, 2359 pp.

DAHAB, M.F. 1987 Treatment Alternatives for Nitrate Contaminated Groundwater Supplies. *Journal of Environmental Systems*. 178 (1): 65-75.

DAHAB, M.F.; GUTER, G.A. and ROGALLA, F. 1991 Experience with nitrate treatment in the United States and Europe. Proceedings, Annual Conference, American Water Works Association, Philadelphia, PA. June 23-27.

DAHAB, M.F. and LEE Y.W. 1988 Nitrate Removal from water supplies using biological denitrification. *Journal Water Pollution Control Federation* 60 (9): 1670-1674.

DAHAB, M.F. and LEE, P.I.Y. 1992. Nitrate reduction by in-situ biodenitrification in groundwater. *Water Science Technology* 26: 1493-1502.

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.

DEGRAFFENREID, N. and SHREVE, G.S. 1998. The effect of Cadmium on the kinetics of Trichloroethylene Biodegradation by Pseudomonas (Burkolderia) picketti Pk01 under denitrifying conditions. *Water Research* **32(11)**: 3398-3402.

DELGADO, J.; RUBIO, J.C.; BEAS, J. and CASTILLO, E. 1991. Estado de las captaciones subterráneas para abastecimiento en el sector noroccidental de la provincia de Granada.. *III Simposium sobre el Agua en Andalucía. Córdoba, 24 a 27 de Septiembre* pp: 339-350

DONOSO, G.; CANCINO, J. And MAGRI, A. 1999. Effects of Agricultural Activities on Water-Pollution with Nitrates and Pesticide in the Central Valley of Chile. *Water Science and Technology* **39(3)**: 49-60.

DOYLE, M.P.; HERMAN, J.G.; DYKSTRA, R.L. 1985. Autocatalitic oxidation of hemoglobin induced by nitrate: Activation and chemical inhibition. *Journal Free Radical Biological Medical* **1**: 145-154

E.C.E.T.O.C., 1988. Nitrate and drinking water. European Chemical Industry Ecology and Toxicology Center, 165 pp: Brussels.

EGERT, M.; HAMANN, A.; KÖMEM, R. and FRIEDRICH, C.G. 1993. Methanol and Methyl amine utilization result from mutational event in Thiosphaera pantotropha. *Archives of Microbiology* **159**: 364-371.

ESNAULT, D. 1996 Far East Landfill Technologies. Ltd., personal communication.

FARIÑAS, M. 1999. Ósmosis inversa: Fundamentos, tecnología y aplicaciones. Mc Graw-Hill.

FELEKE, Z.; ARAKE, K.; SAKAKIBARA, Y.; WATANABE, T. And KURODA, M. 1998. Selective reduction of nitrate to nitrogen gas in a biofilm-electrode reactor. *Water Research* **32(9)**: 2728-2734.

FONSECA, A.D.; CRESPO, J.G.; ALMEIDA, J.S. and REIS, M.A. 2000. Drinking-Water Denitrification using a novel ion-exchange membrane bioreactor. *Environmental Science & Technology* **34(8)**: 1557-1562.

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 metaboliques 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.

FUCHS, W.; SCHATZMAYR, G. and BRAUN, R. 1997. Nitrate removal from drinking-water using membrane-fixed biofilm reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* **48(2)**: 267-274.

GARCÍA, J.L.; CRUZ, J.J.; HIDALGO, M.C. and CARRASCO, 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(6)**: 1277-1280.

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.

GLASS, Ch. and SILVERSTEIN, J. 1999. Denitrification of high-nitrate, high-salinity wastewater. *Water Research* **33(1)**: 223-229.

GÓMEZ, M.A. 1998 Eliminación biológica de nitrato de aguas subterráneas mediante filtros sumergidos: optimización del sistema. Tesis Doctoral. Universidad de Granada

GÓMEZ, M.A.; GONZÁLEZ- LÓPEZ, J. and HONTORIA-GARCÍA, E. 2000b. Influence of carbon source on nitrate removal of contaminated groundwater in a denitrifying submerged filter. *Journal of Hazardous Materials* **80(1-3)**: 69-80.

GÓMEZ, M.A.; MORENO, B.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. y HONTORIA, E. 2000a. Eliminación biológica de nitrato de aguas subterráneas, mediante filtros sumergidos. *Alquibla* **6**: 121- 137.

GÓMEZ, M.A.; ZAMORANO, M.; MORENO, B.; OSORIO, F.; GÓNZÁLEZ-LÓPEZ, J. y HONTORIA, E. 1999. Desnitrificación Biológica de Aguas Subterráneas. *International Conference on Environmental Engineering*. Cartagena (Murcia).

GONZÁLEZ- LÓPEZ, J; GOMEZ, M.A. and HONTORIA, E. 1998 Congreso Internacional de Contaminación de Aguas Subterráneas por Nitratos y Pesticidas. Tetouan (Marruecos).

GOSS, M.J.; BARRY, D.A.J. and RUDOLPH, D.L. 1998. Contamination in Ontario Farmstead Domestic Wells and its association with agriculture -1- Results from Drinking-Water Wells. *Journal of Contamination Hidrology* **32(3-4)**: 267-293.

GRANDE, J.A.; GONZÁLEZ, 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). *Ground Water* **34(1)**: 155-161.

GRAS, H. and ÁLVAREZ, J. 1991. Tratamiento biológico de aguas residuales urbanas por biofiltración sobre material granuloso y nitrificación sobre soporte sumergido. *Tecnología del Agua* **86**: 58-65.

GRASMICK, A.; ELMALEH, S. and BEN AÏM, R. 1979. Théorie de l'épuration par filtration biologique immergée. *Water Research* **13**: 1137.

GREEN, M.; TARRE, S.; SCHNIZER, M.; BOGDAN, B.; ARMON, R. and SHELEF, G. 1994 Groundwater Denitrification Using an Upflow Sludge Blanket Reactor. *Water Research* **28 (3)**: 631-637.

GUTER, G.A. 1987. Nitrate removal from contaminated water supplies: Volume I. Design and Initial performance of a nitrate removal plant, USEPA Report EPA/600/S2-86/115, April.

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

HAMODA, M.F. and ABD-EL-BARY, M.F. 1987. Operating characteristics of the aerated submerged fixed-film (ASFF) bioreactor. *Water Research* **21(8)**: 939-947.

HAYES, A.M.; FLORA, J.R.V. and KHAN J. 1998. Electrolytic stimulation of denitrification in sand columns. *Water Research* **32(9)**: 2830-2834.

HELL, F.; LAHNSTEINER, J.; FRISCHHERZ, H. and BAUMGARTNER, G. 1998. Experience with full-scale electro dialysis for nitrate and hardness removal. *Desalination* **117(1-3)**: 173-180.

HERRERO, M.A.; MALDONADO MAY, V.; CARBÓ, L.; SARDI, G.; ORLANDO, A.; MAZZINI, M.; BONTA, M. and IRAMAIN, S. 2000 Utilización y Niveles de Contaminación de Aguas Subterráneas en Áreas Rurales de la Pradera Pampeana. *Congreso Internacional Uso Eficiente del Agua*. Mendoza (Argentina). 24-29 de Abril de 2000.

HIDALGO, M.C.; CRUZ-SANJULIÁN, J.J. and AUGUSTÍN, C. 1995. Contaminación difusa en un acuífero detrítico debida al uso de fertilizantes y plaguicidas (Depresión de Baza, Granada). *Actas del IV Simposium Nacional de Hidrogeología (Sevilla)*. Pp: 481-494. Ed. Asociación Española de Hidrología Subterránea.

HIJNEN, W.A.M.; JONG, R. and KOOIJ, D.V.D. 1999. Bromate removal in a denitrifying bioreactor used in water treatment. *Water Research* **33(4)**: 1049-1053.

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.

HÖROLD, S.; TACKE, T. and VORLOP K.D. (1993) Catalytical removal of nitrate and nitrite from drinking water-I. Screening for hydrogenation catalysts and influence of reaction conditions on activity and selectivity. *Environmental Technology*, **14**: 931-939.

HUANG, C.P.; WANG, H.W. and CHIU, P.C. 1998. Nitrate reduction by metallic iron. *Water Research*. **32 (8)**: 2257-2264

HUDAK, P.F. 2000. Regional trends in nitrate content of Texas groundwater. *Journal of Hidrology* **228(1-2)**: 37-47.

HUTCHINS, S.R.; MILLER, D.E. and THOMAS, A. 1998. Combined laboratory/field study on the use of nitrate for in-situ bioremediation of a fuel-contaminated aquifer. *Environmental Science & Technology* **32(12)**: 1832-1840.

HUTCHINSON, M. and RIDGWAY, J.W. 1977 Microbiological aspects of drinking water supplies. *In Aquatic Microbiology*. (Skinner, F.A. and Shewan, J.M. eds). Academic press. London.

ISLAM, S. and SUIDAN, M.T. 1998. Electrolytic denitrification – Long-Term performance and effect of current intensity. *Water Research* **32(2)**: 528-536.

JAHN, A.; NIELSEN, P.H. and PALMGREM, R. 1996. Differences in biofilm structure and composition in response to oxygen and carbon limitation. *3th Specialiced Conference on Biofilm System*. Copenhagen.

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. Berlín.

JIMÉNEZ, R.; MOLINA, L.; PULIDO, A. and NAVARRETE, F. 1996. Influencia de la agricultura intensiva en el contenido de nitratos en las aguas del Campo de Dalías: evolución temporal y espacial. *Geogaceta*, **20(6)**: 1281-1284.

KANTARDJIEFF, A. and JONES, J.P. 1997. Practical experiences with aerobic biofilters in tmp (thermomechanical pulping), sulfite and fine paper mills in Canada. *Water Science Technology*, **35**: 227-234.

KERSTERS, K. and DE LEY J. 1984. Genus *Agrobacterium* in Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. Baltimore. Williams & Wilkins.

KLAASSEN, C.; AMDUR, M.O. and DAULL, J. 1986. Toxicology, the basic science of poisons 3^a ed. MacMillan Publishing Company, New York.

KNAPPERT, P.L.; OSKAM, G., 1987. Situation der öffentlichen wasserversorgung in den EG-Mitgliedstaaten aus der sicht der wassergerüte. Proc. *Europäische Konferenz. Einflüsse der Land-Wirtschaft auf die Wasserressourcen Folgen und Zukünftige Entwicklungen*. Berlin.

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.

LAJOIE, C.A.; LAYTON, A.C.; GREGORY, I.R.; SAYLER, G.S.; TAYLOR, D.E. and MEYERS, A.J. 2000 Zoogloeal cluster and sludge dewatering potential in an industrial activated sludge wastewater treatment plant. *Water Environment Research* **72(1)**: 56-64.

- LAZAROVA, V.; BELLAHCEN, D.; MANEN, J.; STAHL, D. and RITTMANN, B. 1999. Influence of operating conditions on population dynamics in nitrifying biofilms. *Water Science Technology* 39(7): 5-11.
- 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 (3-4): 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(5): 1189-1197.
- LAZAROVA, V. and MANEM, J. 1995. Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Research* 29 (10): 2227-2245.
- LAZAROVA, V.; PIERZO, V.; FONTVIELLE, D. and MANEM, J. 1994. Integrated Approach for Biofilm Characterization and Biomass Activity Control. *Water Science and Technology* 29 (7): 345-354.
- LEGLISE, J.P.; GILLES, P. and MOREAUD, H. 1980. A new development in biological aerated filters. *Presented at 53rd Annual WPCF Conference, Las Vegas.*
- LEMMER, H.; ZAGLAUER, A.; NEEF, A.; MEIER, H. and AMANN, R. 1997. Denitrification in a methanol fed fixed bed reactor: Composition and ecology of the bacterial community in the biofilms. *Water Research* 31(8): 1903-1908.
- LEMMER, H.; LIND, G.; SCHADE, M. and ZIEGELMAYER, B. 1998. Autecology of scum producing bacteria. *Water Science and Technology* 37(4-5): 527-530.
- LESSEL, T. and KOPMANN, T. 1991. Erfahrungen mit getauchten Festbettreaktoren für die Nitrifikation. *Korrespondenz Abwasser* 12: 1652-1665.

LEVALLOIS, P.; THERIAULT, M.; ROUFFIGNAT, J.; TESSIER, S.; LANDRY, R.; AYOTTE, P.; GIRARD, M.; GINGRAS, S.; GAUVIN, D. and CHIASSON, C. 1998. Groundwater contamination by nitrates associated with intensive potato culture in Quebec. *Science of the Total Environment* 217(1-2): 91-101.

LIANG, S.; MANN, M.A.; GUTER, G.A.; KIM, P.H.S. and HARDAN, D.L. 1999. Nitrate removal from contaminated groundwater. *Journal American Water Works Association* 91(2): 79-91.

LLOYD, J.W. and HEATHCATE, J.A., 1985. Natural inorganic hydrochemistry in relation to groundwater. Clarendon Press. Oxford pp 459.

LÓPEZ-VERA, F. 1982. Nitrate pollution in Madrid tertiary basin. Proc. 16 th Congress of I.A.H. Prague. 237-247.

LUCAS, M.P.; PANDEY, S.; VILLANO, R.A.; CULANAY, D.R. and OBIEN, S.R. 1999. Characterization and Economic-Analysis of Intensive Cropping Systems in Rain-Fed Lowlands of Ilocos Norte, Philippines. *Experimental Agriculture* 35(2): 211-224.

LUND, L.J.; HORNE, A.J. and WILLIAMS, A.E. 2000. Estimating denitrification in a Large Constructed Wetland using Stable Nitrogen Isotope Ratios. *Ecological Engineering* 14(1-2): 67-76.

MANSELL, B.O. and SCHROEDER, E.D. 1998 Biological Denitrification in a Continuous Flow Membrane Reactor. *Water Science Technology* 38 (1): 9-14.

MARSMAN, E.H.; ROELEVED, P.J.; RENSINK, J.H. 1997. High nutrient removal in the 3-sludge sewage treatment system results and economic evaluation. *Water Science Technology*, 35: 129-136.



- MARTIENSSEN, M. and SCHÖPS, R., 1999. Population dynamics of denitrifying bacteria in a model biocommunity. *Water Research*, **33(3)**: 639-646.
- MARTÍNEZ-TOLEDO, M.V. 1992. Biología del nitrógeno, en interacción planta microorganismo: Biología del nitrógeno pp26-35 (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.
- MIKAC, N.; COSOVIC, B.; AHEL, M.; ANDREIS, S. and TONCIC, Z. 1998. Assessment of groundwater contamination in the vicinity of a municipal solid waste landfill (Zagreb, Croatia). *Water Science Technology* **37(8)**: 37-44.
- MOHSENI-BANDPI, A. and ELLIOT, D.J. 1998. Groundwater denitrification with alternative carbon sources. *Water Science Technology* **38 (6)**: 237-243.
- MOHSENI-BANDPI, A.; ELLIOT, D.J. and MOMENYMAZDEH, A. 1999. Denitrification of groundwater using acetic-acid as a carbon source. *Water Science Technology* **40 (2)**: 53-59.
- 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 N₂O. *FEMS Microbiology and Ecology* **74**: 49-58.
- NYBERG, U.; ASPEGREN, H.; ANDERSSON, B.; JANSEN, J.C.C and VILLADSEN, I.S. 1992. Full-scale application of nitrogen removal with methanol as carbon source. *Water Science Technology* **26**: 827-834.

- NOLAN, B.T.; RUDDY, B.C.; HITT, K.J. and HELSEL, D.R. 1997. Risk of nitrate in groundwaters of the United States – A national perspective. *Environmental Science & Technology* **31(8)**: 2229-2236.
- NOLAN, B.T. and STONER, J.D. 2000. Nutrients in groundwaters of the conterminous United-States 1992-1995. *Environmental Science & Technology* **34(7)**: 1156-1165.
- NURIZZO, C. and MEZZANOTTE, V. 1992. Groundwater biodenitrification on sand fixed film reactor using sugar as organic carbon source. *Water Science Technology* **26**: 827-834.
- OHASHI, A.; KOYAMA, T.; SYUTSUBO, K. and HARADA, H. 1999. A novel method for evaluation of biofilm tensile strength resisting erosion. *Water Science Technology* **39(7)**: 261-268.
- PARAMASIVAN, S. and ALVA, A.K. 1997. Leaching of nitrogen forms from controlled-release nitrogen fertilizers. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **28(17-18)**: 1663-1674.
- PARKER, D.S.; LUTZ, M.P. and PRATT, A.M. 1990. New trickling filter applications in the U.S.A. *Water Science Technology* **22**: 215-226.
- PARKIN, T.B. and ROBINSON, J.A. 1989. Stochastic models of soil denitrification. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 72-77.
- PARTOS, J.; RICHARD, Y. and AMARD. 1985. Elimination de la pollution carbonée par cultures fixées aérobies (Biofor). *T.S.M. Avril*: 193-198.
- 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.

PAYNE, W.J. 1981 Denitrification. Jonh Wiley and Sans Inc. U.S.A. 213 pp.

PEARSON, W.R. and LIPMAN, D.J. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 85: 2444-2448.

PÉREZ TALAVERA, J.L. 2000. La reutilización como complemento de la oferta a la satisfacción de la demanda. Exdperiencias en el uso de membranas. XX Jornadas Técnicas de la Asociación Española de Abastecimientos de Agua y Saneamiento. Granada, Junio de 2000.

PINTAR, A.; BATISTA, J. and LEVEC, J. 1998 Potential of mono and Bimetallic Catalysts for Liquid Phase Hydrogenation of Aqueous Nitrite solutions. *Water Science Technology*. 37(8): 177-185.

PORTER, K.S. 1980. An evaluation of sources of nitrogen as causes of groundwater contamination in Nassaw county, Long Island. *Groundwater* 18: 617-625.

PRASAD, R. 1999 Sustainable Agriculture and Fertilizer Use. *Current Science* 77: 38-43.

PRAT, F. i BOTILL, 2000. Calidad de las aguas subterráneas de la comarca de Osona. *Tecnología del Agua*, 201: 46-60.

PRESCOTT, L.M.; HARLEY, J.P. and KLEIN, D.A., 1999. Microbiología. McGraw Hill. Interamericana. Madrid.

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.

REAL DECRETO 1138/90 de 14 de septiembre por el que se aprueba la Reglamentación Técnico Sanitaria para el abastecimiento y control de la calidad de las aguas potables de consumo público. B.O.E. N° 226 de 20 de Septiembre de 1990.

REDDY, K.J. and LIN, J.P. 2000. Nitrate Removal from Groundwater Using Catalytic Reduction. *Water Research*, **34(3)**: 995-1001.

REILLY, J.F.; HORNE, A.J. and MILLER, C.D. 2000. Nitrate removal from a drinking-water supply with Large Free-Surface Constructed Wetlands Prior to Groundwater Recharge. *Ecological Engineering* **14(1-2)**: 33-47.

RIHN, M.J.; ZHU, X.; SUIDAN, M.T.; KIM, B.J. and KIM, B.R. 1997. The effect of nitrate on voc removal in trickle-bed biofilters. *Water Research* **31(12)**: 2997-3008.

RODINA, A.G. 1972. Methods in aquatic microbiology. *University Park Press*. Baltimore. Butterworths. London.

ROGALLA, F.; BADARD, M.; HANSEN, F. and DANSHOLM, P. 1992. Upscaling a compact nitrogen removal process. *Water Science Technology*, **26**: 1067-1076.

ROGALLA, F.; DE LARMINAT, G.; COUTELLE, J. and GODART, H. 1990. Experiences with nitrate removal methods from drinking water, Proceedings, NATO/Advances Research Workshop on Nitrate Contamination: Exposure, Consequences and Control. Lincoln, NE, Sept. 9-14.

ROLF, F.; GRABOWSKI, F. and BURDE, M. 1998. Low cost procedure for nutrient removal in small rural wastewater treatment plants. *Water Science Technology* **38(3)**: 179-185.

RUDOLPH, D.L.; BARRY, D.A.J. and GOSS, M.J. 1998. Contamination in Ontario Farmstead Domestic Wells and its association with agriculture -2- Results from Multilevel Monitoring Well Installations. *Journal of Contamination Hidrology* **32(3-4)**: 295-311.

SAHUQUILLO HERRÁIZ, A., 1999. La calidad y la contaminación de las aguas subterráneas. *Boletín Geológico y Minero*. **110-4**: 437-450

SAKAKIBARA, Y.; ARAKI, K.; WATANABE, T. and KURODA, M. 1997. The denitrification and neutralization performance of an electrochemically activated biofilm reactor used to treat nitrate- contaminated groundwater. *Water Science and Technology* **36(1)**: 61-68.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., and MANIATIS, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.

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.

SATA, T. and NOJIMA, S. 1999. Transport-Properties of anion-exchange membranes prepared by the reaction of cross-linked membranes having chloromethyl groups with 4-vinylpyridine and trimethylamine. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer physics* **37(15)**: 1773-1785.

SCHOEMAN, J.J. 1998. Modelos de selectividad en electrodiálisis. *Tratamiento del agua por procesos de membrana. Principios, procesos y aplicaciones*. McGraw Hill.

SCHOEMAN, J.J. and THOMPSON, M.A., 1998. Electrodiálisis. *Tratamiento del agua por procesos de membrana. Principios, procesos y aplicaciones*. McGraw Hill.

SHANABLEH, A. and HIJAZI, A. 1998. Treatment of simulated aquaculture water using biofilters subjected to aeration/non-aeration cycles. *Water Science and Technology* **38(8-9)**: 223-231.

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.

SIBONY, 1983.Applications industrielles des cultures fixées en épuration d'eaux résiduaires. 5ème Journée scientifique: l'Eau, la Recherche, l'Environnement. Lille 25-27 octobre: 387-397.

SICH, H. and VAN RIJN, J. 1997. Scanning electron microscopy of biofilm formation in denitrifying fluidised bed reactors. *Water Research* **31 (4)**: 733-742.

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.

SKJOLSTRUP, J.; NIELSEN, P.H.; FRIER, J.O. and MCLEAN, E. 1998. Performance-characteristics of fluidized-bed biofilters in a novel laboratory-scale recirculation system for rainbow-trout-nitrification rates, oxygen-consumption and sludge collection. *Aquacultural engineering* **18(4)**: 265-276.

SMITH, R.A. 1867 On the examination of water for organic matter. Manchester. Let. Philas. Soc. Mem.Ser. **4**: 37-88.

SOARES, M.I.M. and ABELIOVICH, A. 1998. Wheat straw as substrate for water denitrification. *Water Research* **32(12)**: 3790-3794.

SPRENT, J.L.; SUTHERLAND, J.M. and 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* 2ª ed. Reverté. Barcelona. 750 pp.

TARRE, S. and GREEN, M. 1994. Precipitation potential as a major factor in the formation of granular sludge in an upflow sludge-blanket reactor for denitrification of drinking water. *Applied Microbiology and Biotechnology* 42: 482-486.

THAUER, R.K.; JUNGERMANN, K. and DECKER, K. 1977 Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews* 41: 100-180.

THOMAS, K.L.; LLIYD, D. and BODDY, L. 1994 Effects of oxygen, pH and nitrate concentration on denitrification by *Pseudomonas* species. *FEMS Microbiology Letters*. 118: 181-186.

VANDERPLOEG, R.R.; RINGE, H. MACHULLA, G. and HERMSMEYER, D. 1997. Postwar nitrogen use efficiency in West-German agriculture and groundwater quality. *Journal of Environmental Quality* 26(5): 1203-1212.

VINUESA, P., RADEMAKER, J.L.W., DE BRUIJN, F.J. and WERNER, D. (1998) Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* 64:2096-2104.

VOLOKITA, M.; ABELIOVICH, A. and SOARES, M.I.M. 1996a. Denitrification of groundwater using cotton as energy source. *Water Science Technology* 34: 379-385.

VOLOKITA, M.; BELKIN, S.; ABELIOVICH, A. and SOARES, M.I.M. 1996b. Biological denitrification of drinking water using newspaper. *Water Research* 30: 965-971.

W.H.O., 1985 Health Hazards from nitrates in drinking water. Report on W.H.O. meeting of Copenhagen.

WADLEY, S. and BUCKLEY, C.A., 1998. Reactores de membranas de intercambio iónico. *Tratamiento del agua por procesos de membrana. Principios, procesos y aplicaciones*. McGraw Hill.

WATNICK, P. and KOLTER, R. 2000. Biofilm, City of Microbes. *Journal of Bacteriology* **182** (10): 2675-2679.

WEISBURG, W.G., BARNS, S.M., PELLETIER, D.A. and LANE, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* **173**: 697-703.

WILDERER, P.A.; JONES, W.C. and DAN, V. 1987 Competition in denitrification systems affecting reduction rate and accumulation of nitrite. *Water Research* **21**: 239-245.

WILLIAMS, A.E.; JOHNSON, J.A.; LUND, L.J. and KABALA, Z.J. 1998. Spatial and Temporal Variations in Nitrate Contamination of a Rural Aquifer, California. *Journal of Environmental Quality* **27**(5): 1147-1157.

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.

WOODBURY, B.L.; DAHAB, M.F.; MIHÁLTZ, P. and CSIKOR, ZS. 1998 Evaluation of Reversible Fixed-Film Static Bed Bio-Denitrification Reactors. *Water Science Technology* **38**(1): 311-318.

YADAV, S.N. and WALL, D.B. 1998. Benefit-Cost-Analysis of Best Management-Practices Implemented to Control Nitrate Contamination of Groundwater. *Water Resources Research* **34(3)**: 497-504.

YOSHINARI, T. and KNOWLES, K. 1976. Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria. *Biochemistry. Biophysic. Research. Com.* **69**, 705-710.

ZHANG, M.H.; GENG, S. and SMALLWOOD, K.S. 1998. Assessing groundwater nitrate contamination for resource and Landscape Management. *Ambio* **27(3)**: 170-174.

RELACIÓN DE TABLAS

IV.- METODOLOGÍA ANALÍTICA Y MÉTODOS DE ESTUDIO

IV.1.- BACTERIAS DESNITRIFICANTES EMPLEADAS

IV.1.5.- Caracterización de la actividad desnitrificante

- Tabla IV.1.- Identificaciones taxonómicas para cada una de las cepas
desnitrificantes aisladas IV.6.
- Tabla IV.2.- Actividad desnitrificante de las cepas aisladas en la biopelícula y
utilizadas en la investigación como inoculantes selectivos IV.9.

V.- INVESTIGACIÓN DE CHOQUE

V.3.- 1ª FASE DE LA INVESTIGACIÓN A ESCALA DE LABORATORIO

V.3.3.- Conclusiones previas.

- Tabla V.1.- Medida de la absorbancia para diferentes relaciones C/N. V.30.

V.4.- 2ª FASE DE LA INVESTIGACIÓN A ESCALA DE LABORATORIO

V.4.2.- Resultados previos de la 2ª fase

V.4.2.1.- Resultados sobre las muestras de relleno

- Tabla V.2.- Análisis estadístico realizado para los recuentos de microorganismos
en el relleno tras la recirculación para los diferentes tiempos de
recirculación ensayados y los diferentes inoculantes empleados..... V.36.
- Tabla V.3.- Análisis estadístico realizado para los recuentos de microorganismos
en el relleno tras el funcionamiento para los diferentes tiempos de
recirculación ensayados y los diferentes inoculantes empleados..... V.37.
- Tabla V.4.- Análisis estadístico realizado para la actividad desnitrificante en el
relleno tras la recirculación para los diferentes tiempos de
recirculación ensayados y los diferentes inoculantes empleados..... V.40.

V.4.2.2.- Resultados sobre las muestras de agua

- Tabla V.5.- Análisis estadístico realizado para el nitrógeno total en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados y los diferentes inoculantes empleadosV.43.
- Tabla V.6.- Análisis estadístico realizado para el nitrógeno total en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados con licor mezcla como inoculanteV.45.
- Tabla V.7.- Análisis estadístico realizado para el nitrógeno total en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados con *Pseudomonas mendocina* como inoculanteV.46.
- Tabla V.8.- Análisis estadístico realizado para el nitrógeno total en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados con *Agrobacterium radiobacter* como inoculanteV.48.
- Tabla V.9.- Análisis estadístico realizado para el nitrito en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados y los diferentes inoculantes empleadosV.50.
- Tabla V.10.- Análisis estadístico realizado para el nitrito en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados con licor mezcla como inoculanteV.51.
- Tabla V.11.- Análisis estadístico realizado para el nitrito en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados con *Pseudomonas mendocina* como inoculanteV.52.
- Tabla V.12.- Análisis estadístico realizado para el nitrito en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados con *Agrobacterium radiobacter* como inoculanteV.54.
- Tabla V.13.- Análisis estadístico realizado para la turbidez en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados y los diferentes inoculantes empleadosV.54.
- Tabla V.14.- Análisis estadístico realizado para la turbidez en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados con licor mezcla como inoculanteV.55.

Tabla V.15.- Análisis estadístico realizado para la turbidez en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados con <i>Pseudomonas mendocina</i> como inoculante	V.56.
Tabla V.16.- Análisis estadístico realizado para la turbidez en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados con <i>Agrobacterium radiobacter</i> como inoculante	V.57.
Tabla V.17.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados y los diferentes inoculantes empleados	V.59.
Tabla V.18.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados con licor mezcla como inoculante	V.60.
Tabla V.19.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados con <i>Pseudomonas mendocina</i> como inoculante	V.62.
Tabla V.20.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados con <i>Agrobacterium radiobacter</i> como inoculante	V.63.
Tabla V.21.- Análisis estadístico realizado para el recuento de coliformes en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación ensayados con licor mezcla como inoculante	V.65.

V.5.- 3ª FASE DE LA INVESTIGACIÓN A ESCALA DE LABORATORIO

V.5.2.- Resultados previos de la 3ª fase

V.5.2.1.- Resultados sobre las muestras de relleno

Tabla V.22.- Análisis estadístico realizado para la actividad desnitrificante en el relleno tras la recirculación para los diferentes inoculantes empleados	V.71.
Tabla V.23.- Análisis estadístico realizado para la actividad desnitrificante en el relleno tras el funcionamiento para los diferentes inoculantes empleados	V.72.
Tabla V.24.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el relleno tras la recirculación para los diferentes inoculantes empleados	V.74.

Tabla V.25.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el relleno tras el funcionamiento para los diferentes inoculantes empleadosV.75.

V.5.2.2.- Resultados sobre las muestras de agua

Tabla V.26.- Análisis estadístico realizado para la concentración de nitrógeno total en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 díasV.77.

Tabla V.27.- Análisis estadístico realizado para la concentración de nitrito en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 díasV.79.

Tabla V.28.- Análisis estadístico realizado para la turbidez en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 díasV.81.

Tabla V.29.- Análisis estadístico realizado para el recuento diario de microorganismos en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleadosV.83.

V.6.- 4ª FASE DE LA INVESTIGACIÓN A ESCALA DE LABORATORIO

V.6.2.- Resultados previos de la 4ª fase

V.6.2.1.- Resultados de la mezcla *Ps. mendocina* y *Ps. fluorescens*

Tabla V.30.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el relleno tras la recirculación para los diferentes inoculantes empleadosV.88.

Tabla V.31.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el relleno tras el funcionamiento para los diferentes inoculantes empleadosV.88.

Tabla V.32.- Análisis estadístico realizado para la actividad desnitrificante en el relleno tras la recirculación para los diferentes inoculantes empleadosV.89.

Tabla V.33.- Análisis estadístico realizado para la actividad desnitrificante en el relleno tras el funcionamiento para los diferentes inoculantes empleadosV.90.

Tabla V.34.- Análisis estadístico realizado para la concentración de nitrógeno total en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 días	V.92.
Tabla V.35.- Análisis estadístico realizado para la concentración de nitrito en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 días	V.93.
Tabla V.36.- Análisis estadístico realizado para la turbidez en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 días	V.94.
Tabla V.37.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento	V.95.
V.6.2.2.- Resultados de la mezcla <i>Ag. radiobacter</i> y <i>Ps. fluorescens</i>	
Tabla V.38.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el relleno tras la recirculación para los diferentes inoculantes empleados	V.97.
Tabla V.39.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el relleno tras el funcionamiento para los diferentes inoculantes empleados	V.98.
Tabla V.40.- Análisis estadístico realizado para la actividad desnitrificante en el relleno tras la recirculación para los diferentes inoculantes empleados	V.99.
Tabla V.41.- Análisis estadístico realizado para la actividad desnitrificante en el relleno tras el funcionamiento para los diferentes inoculantes empleados	V.99.
Tabla V.42.- Análisis estadístico realizado para la concentración de nitrógeno total en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 días	V.101.
Tabla V.43.- Análisis estadístico realizado para la concentración de nitrito en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 días	V.1102.

Tabla V.44.- Análisis estadístico realizado para la turbidez en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 díasV.104.

Tabla V.45.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamientoV.105.

V.6.2.3.- Resultados de la mezcla *Ps. mendocina*, *Ag. radiobacter* y *Ps. fluorescens*

Tabla V.46.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el relleno tras la recirculación para los diferentes inoculantes empleadosV.108.

Tabla V.47.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el relleno tras el funcionamiento para los diferentes inoculantes empleadosV.108.

Tabla V.48.- Análisis estadístico realizado para la actividad desnitrificante en el relleno tras la recirculación para los diferentes inoculantes empleadosV.109.

Tabla V.49.- Análisis estadístico realizado para la actividad desnitrificante en el relleno tras el funcionamiento para los diferentes inoculantes empleadosV.110.

Tabla V.50.- Análisis estadístico realizado para la concentración de nitrógeno total en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 díasV.111.

Tabla V.51.- Análisis estadístico realizado para la concentración de nitrito en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamientoV.113.

Tabla V.52.- Análisis estadístico realizado para la turbidez en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 díasV.114.

Tabla V.53.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamientoV.115.

V.6.2.4.- Resultados de la mezcla *Ps. mendocina* y *Ag. radiobacter*

- Tabla V.54.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el relleno tras la recirculación para los diferentes inoculantes empleadosV.116.
- Tabla V.55.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el relleno tras el funcionamiento para los diferentes inoculantes empleadosV.117.
- Tabla V.56.- Análisis estadístico realizado para la actividad desnitrificante en el relleno tras la recirculación para los diferentes inoculantes empleadosV.118.
- Tabla V.57.- Análisis estadístico realizado para la actividad desnitrificante en el relleno tras el funcionamiento para los diferentes inoculantes empleadosV.119.
- Tabla V.58.- Análisis estadístico realizado para la concentración de nitrógeno total en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 díasV.120.
- Tabla V.59.- Análisis estadístico realizado para la concentración de nitrito en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamientoV.121.
- Tabla V.60.- Análisis estadístico realizado para la turbidez en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 díasV.122.
- Tabla V.61.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamientoV.123.

V.6.2.5.- Resultados de la mezcla *Ag. radiobacter* y *Ps. picketii*

- Tabla V.62.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el relleno tras la recirculación para los diferentes inoculantes empleadosV.124.
- Tabla V.63.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el relleno tras el funcionamiento para los diferentes inoculantes empleadosV.125.

Tabla V.64.- Análisis estadístico realizado para la actividad desnitrificante en el relleno tras la recirculación para los diferentes inoculantes empleados	V.126.
Tabla V.65.- Análisis estadístico realizado para la actividad desnitrificante en el relleno tras el funcionamiento para los diferentes inoculantes empleados	V.126.
Tabla V.66.- Análisis estadístico realizado para la concentración de nitrógeno total en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 días	V.127.
Tabla V.67.- Análisis estadístico realizado para la concentración de nitrito en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento	V.129.
Tabla V.68.- Análisis estadístico realizado para la turbidez en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento de 7 días	V.130.
Tabla V.69.- Análisis estadístico realizado para el recuento de microorganismos en el agua de salida para los diferentes inoculantes empleados y para el tiempo de funcionamiento	V.131.

RELACIÓN DE FIGURAS

I.- INTRODUCCIÓN

I.1.- PROBLEMÁTICA ACTUAL DE LA CONTAMINACIÓN DE AGUAS SUBTERRÁNEAS POR NITRATO

I.1.2.- Grado actual de la contaminación de los acuíferos

Figura I.1.- Mapa de puntos de la red de control con presencia de nitratosI.16.

I.1.3.- Problemas sociales desencadenados

I.1.3.2.- Eutrofización

Figura I.2.- Volumen degradado con respecto a la capacidad total de embalse por ámbitos de planificaciónI.24.

I.3.- PROCESOS BIOLÓGICOS DE DESNITRIFICACIÓN

I.3.1.- Ciclo del nitrógeno

Figura I.3.- Ciclo del nitrógenoI.43.

I.3.3.- Aplicación del proceso de desnitrificación

I.3.3.1.- Biopelículas: concepto y funcionamiento.

Figura I.4.- Aspecto de biopelícula formada sobre un soporte cerámico procedente de residuos de la construcciónI.57.

I.3.3.2.- Sistemas para aplicar el proceso de desnitrificación

Figura I.5.- Aspecto de algunos sistemas de biopelículaI.60.

V.- INVESTIGACIÓN DE CHOQUE

V.1.- DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA PILOTO A ESCALA DE LABORATORIO

Figura V.1.- Plantas a escala de laboratorio empleadas en la inoculación selectiva . V.4.

Figura V.2.- Relleno cerámico empleado en las plantas de laboratorio V.5.

Figura V.3.- Esquema del funcionamiento de la planta V.7.

V.3.- 1ª FASE DE LA INVESTIGACIÓN A ESCALA DE LABORATORIO

V.3.2.- Resultados previos de la 1ª fase

- Figura V.4.- Recuentos de *Pseudomonas mendocina* en el relleno tras la recirculación y tras 12 horas de funcionamientoV.11.
- Figura V.5.- Proteínas en el soporte tras la recirculación con cultivo de *Pseudomonas mendocina* y tras 12 horas de funcionamientoV.11.
- Figura V.6.- Peso seco en el relleno tras la recirculación con cultivo de *Pseudomonas mendocina* y tras 12 horas de funcionamiento V.6.
- Figura V.7.- Concentración de nitrato en agua de salida empleando *Pseudomonas mendocina* como inoculanteV.13.
- Figura V.8.- Recuentos microorganismos en agua de salida empleando *Pseudomonas mendocina* como inoculanteV.13.
- Figura V.9.- Muestra de relleno tras 24 horas de recirculación, empleando *Pseudomonas mendocina* como inoculanteV.14.
- Figura V.10.- Biopelícula formada sobre residuo con una coacción elevadaV.16.
- Figura V.11.- Ensayo de sedimentación del agua de salida de la planta tras realizar el lavado, sin previa formación de biopelículaV.18.
- Figura V.12.- Biopelícula formada sobre residuo procedente del rechazo por roturaV.19.
- Figura V.13.- Nuevo material soporte empleado en la investigación procedente del rechazo por rotura, una vez machado, lavado y tamizadoV.20.
- Figura V.14.- Actividad desnitrificante empleando cultivo de *Pseudomonas mendocina* y un nuevo material soporte procedente del rechazo por roturaV.21.
- Figura V.15.- Concentración de nitrato en el agua tratada empleando cultivo de *Pseudomonas mendocina* y un nuevo material soporte procedente del rechazo por roturaV.22.
- Figura V.16.- Turbidez agua de salida empleando cultivo de *Pseudomonas mendocina* y un nuevo material soporte procedente del rechazo por roturaV.22.
- Figura V.17.- Muestras de relleno tras 24 horas de recirculación empleando cultivo de *Pseudomonas mendocina* y un nuevo material soporte procedente del rechazo por roturaV.24.
-

- Figura V.18.- Muestras de relleno tras 24 horas de recirculación y 24 horas de funcionamiento empleando cultivo de *Pseudomonas mendocina* y un nuevo material soporte procedente del rechazo por roturaV.24.
- Figura V.19.- Muestras de relleno tras 48 horas de recirculación empleando cultivo de *Pseudomonas mendocina* y un nuevo material soporte procedente del rechazo por roturaV.25.
- Figura V.20.- Muestras de relleno tras 48 horas de recirculación y 24 horas de funcionamiento empleando cultivo de *Pseudomonas mendocina* y un nuevo material soporte procedente del rechazo por roturaV.25.
- Figura V.21.- Muestras de relleno tras 72 horas de recirculación empleando cultivo de *Pseudomonas mendocina* y un nuevo material soporte procedente del rechazo por roturaV.26.
- Figura V.22.- Muestras de relleno tras 72 horas de recirculación y 24 horas de funcionamiento empleando cultivo de *Pseudomonas mendocina* y un nuevo material soporte procedente del rechazo por roturaV.26.
- Figura V.23.- Muestras de relleno tras 4 horas en recirculación con EPS y 21 horas con el cultivo de *Pseudomonas mendocina*V.28.
- Figura V.24.- Muestras de relleno tras 4 horas en recirculación con EPS, 21 horas en recirculación con el cultivo de *Pseudomonas mendocina* y 24 horas de funcionamientoV.28.

V.4.- 2ª FASE DE LA INVESTIGACIÓN A ESCALA DE LABORATORIO

V.4.2.- Resultados previos de la 2ª fase

V.4.2.1.- Resultados sobre las muestras de relleno

- Figura V.25.- Recuento de microorganismos en el relleno frente a los días de recirculación para diferentes inoculantesV.35.
- Figura V.26.- Recuento de microorganismos en el relleno tras el funcionamiento frente a los días de recirculación para diferentes inoculantesV.36.
- Figura V.27.- Diferencias entre recuentos de microorganismos tras funcionamiento y recirculación para los diferentes inoculantes y los diferentes tiempos de recirculaciónV.38.
- Figura V.28.- Actividad desnitrificante en el relleno frente a los días de recirculación para diferentes inoculantesV.39.

Figura V.29.- Diferencias en actividad desnitrificante tras funcionamiento y recirculación para los diferentes inoculantes y los diferentes tiempos de recirculación	V.41.
Figura V.30.- Fotografía obtenida mediante microscopía de barrido de superficie para la inoculación realizada con <i>Agrobacterium radiobacter</i> , tras 1 día de recirculación con el inóculo	V.42.
Figura V.31.- Fotografía obtenida mediante microscopía de barrido de superficie para la inoculación realizada con <i>Agrobacterium radiobacter</i> , tras 1 día de recirculación con el inóculo y tras el período de funcionamiento de 1 semana	V.42.
V.4.2.2.- Resultados sobre las muestras de agua	
Figura V.32.- Nitrógeno total en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación empleando licor mezcla como inoculante	V.44.
Figura V.33.- Nitrógeno total en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación empleando <i>Pseudomonas mendocina</i> como inoculante .	V.46.
Figura V.34.- Nitrógeno total en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación empleando <i>Agrobacterium radiobacter</i> como inoculante	V.47.
Figura V.35.- Rendimiento medio semanal en eliminación de N total para diferentes tiempos de recirculación y diferentes inoculantes	V.49.
Figura V.36.- Concentración de nitrito en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación empleando licor mezcla como inoculante	V.50.
Figura V.37.- Concentración de nitrito en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación empleando <i>Pseudomonas mendocina</i> como inoculante	V.52.
Figura V.38.- Concentración de nitrito en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación empleando <i>Agrobacterium radiobacter</i> como inoculante	V.53.
Figura V.39.- Turbidez en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación empleando licor mezcla como inoculante	V.55.
Figura V.40.- Turbidez en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación empleando <i>Pseudomonas mendocina</i> como inoculante .	V.56.

Figura V.41.- Turbidez en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación empleando <i>Agrobacterium radiobacter</i> como inoculante	V.57.
Figura V.42.- Turbidez media semanal en agua de salida para diferentes tiempos de recirculación y diferentes inoculantes	V.58.
Figura V.43.- Microorganismos en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación empleando licor mezcla como inoculante	V.60.
Figura V.44.- Microorganismos en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación empleando <i>Pseudomonas mendocina</i> como inoculante	V.61.
Figura V.45.- Microorganismos en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación empleando <i>Agrobacterium radiobacter</i> como inoculante	V.62.
Figura V.46.- Microorganismos media semanal en agua de salida para diferentes tiempos de recirculación y diferentes inoculantes	V.64.
Figura V.47.- Coliformes totales en el agua de salida para los diferentes tiempos de recirculación empleando licor mezcla como inoculante	V.65.

V.5.- 3ª FASE DE LA INVESTIGACIÓN A ESCALA DE LABORATORIO

V.5.1.- Variables y parámetros de la 3ª fase de la investigación de choque

Figura V.48.- Siembra de la cepa <i>Ps. fluorescens</i> en medio de cultivo rico en nutrientes	V.69.
--	-------

V.5.2.- Resultados previos de la 3ª fase

V.5.2.1.- Resultados sobre las muestras de relleno

Figura V.49.- Actividad desnitrificante tras la recirculación para diferentes cepas ..	V.71.
Figura V.50.- Actividad desnitrificante tras el funcionamiento para diferentes cepas	V.72.
Figura V.51.- Recuento microorganismos en el relleno tras la recirculación para diferentes cepas	V.73.
Figura V.52.- Recuento microorganismos en el relleno tras el funcionamiento para diferentes cepas	V.74.

V.5.2.2.- Resultados sobre las muestras de agua

Figura V.53.- Nitrógeno total diario en el agua de salida para diferentes cepas	V.76.
Figura V.54.- Rendimiento medio semanal en eliminación de N total	V.77.

Figura V.55.- Concentración de nitrito diaria en el agua de salida para diferentes cepas	V.79.
Figura V.56.- Valor diario de la turbidez en el agua de salida para diferentes cepas.	V.81.
Figura V.57.- Recuento de microorganismos diario en el agua de salida para diferentes cepas	V.82.
Figura V.58.- Recuento medio de microorganismos semanal en agua de salida para diferentes cepas	V.83.

V.6.- 4ª FASE DE LA INVESTIGACIÓN A ESCALA DE LABORATORIO

V.6.2.- Resultados previos de la 4ª fase

V.6.2.1.- Resultados de la mezcla *Ps. mendocina* y *Ps. fluorescens*

Figura V.59.- Recuento microorganismos en el relleno para <i>Ps. mendocina</i> , <i>Ps. fluorescens</i> y la mezcla de ambas	V.87.
Figura V.60.- Actividad desnitrificante para <i>Ps. mendocina</i> , <i>Ps. fluorescens</i> y la mezcla de ambas	V.89.
Figura V.61.- Nitrógeno total en el agua de salida para <i>Ps. mendocina</i> , <i>Ps. fluorescens</i> y la mezcla de ambas	V.91.
Figura V.62.- Concentración de nitrito en el agua de salida para <i>Ps. mendocina</i> , <i>Ps. fluorescens</i> y la mezcla de ambas.....	V.92.
Figura V.63.- Turbidez en el agua de salida para <i>Ps. mendocina</i> , <i>Ps. fluorescens</i> y la mezcla de ambas.....	V.94.
Figura V.64.- Microorganismos en el agua de salida para <i>Ps. mendocina</i> , <i>Ps. fluorescens</i> y la mezcla de ambas	V.95.

V.6.2.2.- Resultados de la mezcla *Ag. radiobacter* y *Ps. fluorescens*

Figura V.65.- Recuento microorganismos en el relleno para <i>Ag. radiobacter</i> , <i>Ps. fluorescens</i> y la mezcla de ambas	V.97.
Figura V.66.- Actividad desnitrificante para <i>Ag. radiobacter</i> , <i>Ps. fluorescens</i> y la mezcla de ambas	V.98.
Figura V.67.- Nitrógeno total en el agua de salida para <i>Ag. radiobacter</i> , <i>Ps. fluorescens</i> y la mezcla de ambas	V.100.
Figura V.68.- Concentración de nitrito en el agua de salida para <i>Ag. radiobacter</i> , <i>Ps. fluorescens</i> y la mezcla de ambas.....	V.102.

Figura V.69.- Turbidez en el agua de salida para *Ag. radiobacter*, *Ps. fluorescens*
y la mezcla de ambasV.103.

Figura V.70.- Microorganismos en el agua de salida para *Ag. radiobacter*, *Ps.*
fluorescens y la mezcla de ambasV.105.

**V.6.2.3.- Resultados de la mezcla *Ps. mendocina*, *Ag. radiobacter* y *Ps.*
*fluorescens***

Figura V.71.- Recuento microorganismos en el relleno para *Ps. mendocina*, *Ag.*
radiobacter, *Ps. fluorescens* y la mezcla de las tresV.107.

Figura V.72.- Actividad desnitrificante para *Ps. mendocina*, *Ag. radiobacter*, *Ps.*
fluorescens y la mezcla de las tresV.109.

Figura V.73.- Nitrógeno total en el agua de salida para *Ps. mendocina*, *Ag.*
radiobacter, *Ps. fluorescens* y la mezcla de las tresV.111.

Figura V.74.- Concentración de nitrito diaria en el agua de salida para *Ps.*
mendocina, *Ag. radiobacter*, *Ps. fluorescens* y la mezcla de las tres..V.112.

Figura V.75.- Valor diario de la turbidez en el agua de salida para *Ps. mendocina*,
Ag. radiobacter, *Ps. fluorescens* y la mezcla de las tresV.113.

Figura V.76.- Recuento de microorganismos diario en el agua de salida para *Ps.*
mendocina, *Ag. radiobacter*, *Ps. fluorescens* y la mezcla de las tres .V.114.

V.6.2.4.- Resultados de la mezcla *Ps. mendocina* y *Ag. radiobacter*

Figura V.77.- Recuento microorganismos en el relleno para *Ps. mendocina*, *Ag.*
radiobacter y la mezcla de ambasV.117.

Figura V.78.- Actividad desnitrificante para *Ps. mendocina*, *Ag. radiobacter* y la
mezcla de ambasV.118.

Figura V.79.- Nitrógeno total en el agua de salida para *Ps. mendocina*, *Ag.*
radiobacter y la mezcla de ambasV.119.

Figura V.80.- Concentración de nitrito en el agua de salida para *Ps. mendocina*,
Ag. radiobacter y la mezcla de ambas.....V.121.

Figura V.81.- Valor diario de la turbidez en el agua de salida para *Ps. mendocina*,
Ag. radiobacter y la mezcla de ambas.....V.122.

Figura V.82.- Recuento de microorganismos en el agua de salida para *Ps.*
mendocina, *Ag. radiobacter* y la mezcla de ambasV.123.

V.6.2.5.- Resultados de la mezcla *Ag. radiobacter* y *Ps. picketii*

Figura V.83.- Recuento microorganismos en el relleno para <i>Ag. radiobacter</i> , <i>Ps. picketii</i> y la mezcla de ambas	V.124.
Figura V.84.- Actividad desnitrificante para <i>Ag. radiobacter</i> , <i>Ps. picketii</i> y la mezcla de ambas	V.125.
Figura V.85.- Nitrógeno total en el agua de salida para <i>Ag. radiobacter</i> , <i>Ps. picketii</i> y la mezcla de ambas	V.127.
Figura V.86.- Concentración de nitrito en el agua de salida para <i>Ag. radiobacter</i> , <i>Ps. picketii</i> y la mezcla de ambas.....	V.128.
Figura V.87.- Turbidez en el agua de salida para <i>Ag. radiobacter</i> , <i>Ps. picketii</i> y la mezcla de ambas.....	V.129.
Figura V.88.- Microorganismos en el agua de salida para <i>Ag. radiobacter</i> , <i>Ps. picketii</i> y la mezcla de ambas	V.130.

VI.- INVESTIGACIÓN DE FONDO

VI.1.- DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA PILOTO A ESCALA SEMI-TÉCNICA

Figura VI.1.- Filtro biológico a escala semi-técnica empleado en la investigación de fondo	VI.3.
Figura VI.2.- Esquema del funcionamiento de la planta piloto a escala semi-técnica	VI.4.
Figura VI.3.- Dimensiones de la planta a escala semi-técnica.....	VI.5.
Figura VI.4.- Disposición de los muestreadores en la planta piloto	VI.6.

VI.4.- RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN DE FONDO

VI.4.1.- Influencia de la carga hidráulica

Figura VI.5.- Concentración de nitrato y nitrito para $Ch = 10 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$	VI.13.
Figura VI.6.- Turbidez para $Ch = 10 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$	VI.14.
Figura VI.7.- Concentración de nitrato y nitrito para $Ch = 12,5 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$	VI.15.
Figura VI.8.- Turbidez para $Ch = 12,5 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$	VI.15.
Figura VI.9.- Concentración de nitrato y nitrito para $Ch = 15 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$	VI.16.

Figura VI.10.- Turbidez para $Ch = 15 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$	VI.17.
Figura VI.11.- Concentración de nitrato y nitrito para $Ch = 20 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$	VI.17.
Figura VI.12.- Turbidez para $Ch = 20 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$	VI.18.
Figura VI.13.- Concentración de nitrato y nitrito para $Ch = 30 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$	VI.19.
Figura VI.14.- Turbidez para $Ch = 30 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$	VI.20.
Figura VI.15.- Concentración de nitrato y nitrito para $Ch = 39 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$	VI.21.
Figura VI.16.- Turbidez para $Ch = 39 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$	VI.21.
Figura VI.17.- Relación entre la carga hidráulica y las concentraciones de nitrato y nitrito en el efluente para una entrada media de nitrato de 100 mg/l .	VI.22.
Figura VI.18.- Relación entre la carga hidráulica y la turbidez del efluente para una entrada media de nitrato de 100 mg/l	VI.23.
VI.4.2.- <u>Influencia de la carga superficial</u>	
Figura VI.19.- Concentración de nitrato y nitrito para $Ch = 39 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ y $Cs = 4$ $\text{kgNO}_3^-/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ (Valor medio nitrato entrada = 103 mg/l)	VI.24.
Figura VI.20.- Turbidez para $Ch = 39 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ y $Cs = 4 \text{ kgNO}_3^-/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ (Valor medio nitrato entrada = 103 mg/l).....	VI.25.
Figura VI.21.- Concentración de nitrato y nitrito para $Ch = 39 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ y $Cs =$ $5,5 \text{ kgNO}_3^-/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ (Valor medio nitrato entrada = 103 mg/l).....	VI.26.
Figura VI.22.- Turbidez para $Ch = 39 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ y $Cs = 5,5 \text{ kgNO}_3^-/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ (Valor medio nitrato entrada = 103 mg/l).....	VI.26.
Figura VI.23.- Concentración de nitrato y nitrito para $Ch = 39 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ y $Cs = 7$ $\text{kgNO}_3^-/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ (Valor medio nitrato entrada = 103 mg/l)	VI.27.
Figura VI.24.- Turbidez para $Ch = 39 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ y $Cs = 7 \text{ kgNO}_3^-/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ (Valor medio nitrato entrada = 103 mg/l).....	VI.27.
Figura VI.25.- Concentración de nitrato y nitrito para $Ch = 39 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ y $Cs = 9$ $\text{kgNO}_3^-/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ (Valor medio nitrato entrada = 103 mg/l)	VI.28.
Figura VI.26.- Turbidez para $Ch = 39 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ y $Cs = 9 \text{ kgNO}_3^-/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ (Valor medio nitrato entrada = 103 mg/l).....	VI.29.
Figura VI.27.- Relación entre la carga superficial y las concentraciones de nitrato y nitrito en el efluente para una carga hidráulica de $39 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$	VI.30.
Figura VI.28.- Relación entre la carga superficial y la turbidez del efluente para una carga hidráulica de $39 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$	VI.31.

VI.4.3.- Recuperación tras lavados

Figura VI.29.- Recuperación del sistema tras los lavados VI.32.

VI.4.4.- Comportamiento de la DQO

Figura VI.30.- Relación entre la carga hidráulica y la DQO en el efluente para una
entrada media de nitrato de 100 mg/l VI.33.

Figura VI.31.- Relación entre la carga superficial y la DQO en el efluente para
una carga hidráulica de $39 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ VI.33.

IX.- DISEÑO DE LA PLANTA A ESCALA INDUSTRIAL

Figura IX.1.- Esquema de la planta a escala industrial IX.2.

Figura IX.2.- Aspecto de las boquillas colocadas en el fondo del filtro biológico ... IX.2.

Figura IX.3.- Depósito de recirculación de 25 litros IX.3.

Figura IX.4.- Depósito de etanol y bomba dosificadora..... IX.4.

Figura IX.5.- Caja de insonorización donde se encuentra instalado el soplante IX.5.

Figura IX.6.- Bomba de lavado IX.5.

Figura IX.7.- Aliviadero de seguridad conectado con la red de alcantarillado IX.6.

Figura IX.8.- Vista general de la planta IX.6.